

ベヘン酸を含むトリアシルグリセロールの難消化性 構造脂質としての利用可能性に関する研究

| | |
|--------|---|
| 著者 | 金小路 真紀子 |
| 学位授与機関 | Tohoku University |
| 学位授与番号 | 11301甲第16080号 |
| URL | http://hdl.handle.net/10097/58244 |

ベヘン酸を含むトリアシルグリセロールの
難消化性構造脂質としての利用可能性に関する研究

金 小 路 真 紀 子

ベヘン酸を含むトリアシルグリセロールの 難消化性構造脂質としての利用可能性に関する研究

-目次-

| | |
|---|-----|
| 第1章 序論 | 1 |
| 第2章 難消化性構造脂質の検証 | |
| 長鎖飽和脂肪酸がこれを含むトリアシルグリセロールの加水分解に与える影響 | 5 |
| 第3章 難消化性構造脂質 1(3)-behenoyl-2,3(1)-dioleoyl- <i>rac</i> -glycerol(BOO)の胸管 リンパへの吸収性の検証 | |
| 第1節 BOO の胸管リンパへの吸収性の評価 | 16 |
| 第2節 BOO が他のトリアシルグリセロールのリンパ吸収に与える影響 | 29 |
| 第4章 難消化性構造脂質 BOO の有効性の検証 | |
| 第1節 BOO 摂取によるラットでの血中および肝臓トリアシルグリセロール、内臓脂肪、 脂肪排泄に与える影響 | 36 |
| 第2節 BOO 摂取によるラット肝臓での脂質代謝関連酵素に与える影響 | 48 |
| 第3節 BOO 摂取によるヒトでの脂肪排泄に与える影響 | 56 |
| 第5章 難消化性構造脂質 BOO の安全性の検証 | |
| 第1節 BOO 摂取による各組織でのベヘン酸の存在についての検証 | 67 |
| 第2節 BOO 摂取後の血漿および肝臓ベヘン酸の挙動についての検証 | 86 |
| 第6章 総括 | 94 |
| 引用文献 | 97 |
| 謝辞 | 104 |

略語一覧

| | |
|-------|-----------------------|
| TAG | トリアシルグリセロール |
| Cl | カプリル酸 (C8:0) |
| Cn | カプリン酸 (C10:0) |
| La | ラウリン酸 (C12:0) |
| P | パルミチン酸 (C16:0) |
| S | ステアリン酸 (C18:0) |
| B | ベヘン酸 (C22:0) |
| O | オレイン酸 (C18:1) |
| Li | リノール酸 (C18:2) |
| Ln | リノレン酸 (C18:3) |
| A | アラキドン酸 (C20:4) |
| SFA | 飽和脂肪酸 |
| MUFA | 一価不飽和脂肪酸 |
| PUFA | 多価不飽和脂肪酸 |
| HPLC | 高速液体クロマトグラフィー |
| GOT | グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ |
| GPT | グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ |
| VLDL | 超低密度リポタンパク質 |
| FAS | 脂肪酸合成酵素 |
| CPT | カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ |
| ACO | アシル-CoA オキシダーゼ |
| ME | リンゴ酸酵素 |
| G6PDH | グルコース-6-リン酸脱水素酵素 |
| PC | ホスファチジルコリン |
| PE | ホスファチジルエタノールアミン |
| PI | ホスファチジルイノシトール |
| PS | ホスファチジルセリン |
| CL | カルジオリピン |

第 1 章 序論

食生活の欧米化や慢性的な運動不足によってエネルギーの摂取が消費を上回る状態が続き、余剰エネルギーが内臓脂肪となって蓄積した状態を肥満という(1-5)。肥満はインスリン抵抗性を誘発し、それに伴ってリポタンパク質代謝異常、血圧高値および血糖高値を合併するメタボリックシンドロームを引き起こす(6)。メタボリックシンドロームは脳血管疾患や心血管疾患のリスクファクターとなることが示されており(7)、肥満の予防・改善は非常に重要である。日本における肥満者の割合は20歳以上の男性の30%、女性の22%であり、ここ数年減少していない(8)。厚生労働省が推進している「健康日本 21」の取り組みでは、肥満改善には適度な運動と食生活の改善が重要と設定されているが、肥満者割合の目標値(男性:15%以下、女性:20%)を達成することが出来ていない(9)。

肥満は摂取カロリーの過多だけではなく、脂質に偏ったバランスの悪い食事も原因となる。実際、日本人の平均摂取カロリーは戦後横ばいか、むしろわずかに減少している(10)。さらに三大栄養素の摂取量の推移を見ると、タンパク質の摂取量に大きな変化はないが、炭水化物の摂取量が減少し、脂質の摂取量が増加している。このような食事のアンバランスを解消すること、すなわち食事油脂の摂取量を減らす、あるいは食事油脂の吸収を抑制できるような食品素材を摂取することが必要と考えられる。

食事油脂の大部分を占めるトリアシルグリセロール(TAG)は、膵リパーゼにより加水分解され、2 分子の脂肪酸と 2-モノアシルグリセロール(2-MAG)が生成する(11)。生成した脂肪酸と 2-MAG は胆汁酸と胆汁酸ミセルを形成し、小腸上皮細胞より吸収される。このような TAG の消化吸収過程を踏まえ、食事油脂の吸収を抑制する方法の 1 つとして、膵リパーゼの活性を阻害する方法がある。この方法は、リパーゼ阻害物質が膵リパーゼの活性部位に結合して、膵リ

パーゼを失活させることを利用したものである(12,13)。そのため、消化管からの食事油脂の吸収を抑制することができ、結果として体重の減少をもたらすことが報告されている(14-20)。この強力なリパーゼ阻害を持つリパーゼ阻害剤は米国を中心に肥満症治療薬として使用されているが、吸収されなかったかなりの量の食事油脂はそのまま糞便へと排泄されるため、リパーゼ阻害剤は脂肪便や下痢など胃腸への副作用を引き起こすこともある(19-21)。さらに、食事油脂と共に小腸から脂溶性ビタミンは吸収されるが、リパーゼ阻害剤による食事油脂の吸収抑制と同時に脂溶性ビタミンが阻害されることも報告されている(15,21)。

近年では機能性食品の利用による肥満の改善も盛んに取り組まれている。日本では、機能性食品に対して一定のエビデンスを取得することで、目的の機能が表示できる保健機能食品制度がある。臍リパーゼの活性阻害作用を示す機能性食品素材として、ウーロン茶重合ポリフェノールや茶カテキンなどがあり(22-26)、特定保健用食品として多く利用されている。これらの摂取では過度な食事油脂の吸収の抑制は起こらないことが報告されている(23,26)。これら以外にも内臓脂肪の蓄積抑制効果をクレームとし、「体脂肪の気になる方に」との表示が許可された特定保健用食品が多数上市されている。

食事油脂の吸収を抑制するリパーゼ活性阻害物質とは異なる方法として、TAGの加水分解物の胆汁酸ミセルへの溶解を阻害する方法が挙げられる。脂肪酸の中でも炭素数16のパルミチン酸や炭素数18のステアリン酸のような長鎖飽和脂肪酸は、炭素数18の不飽和脂肪酸であるオレイン酸と比べて生体内での吸収率が低いことが、これまでの数多くの検討から報告されている(27-29)。加水分解により生成した長鎖飽和脂肪酸は融点が高く(パルミチン酸: 62.9℃・ステアリン酸: 69.9℃)、また小腸内でカルシウムなどの二価カチオンと結合して不溶性塩を形成する(30)。そのため、胆汁酸ミセルに溶解できずに糞便へと排泄され、低吸収となることが示されている。

消化されにくい TAG の摂取も食事油脂の吸収を抑制する方法として考えられる。臍リパー

ぜにより TAG が加水分解されにくいと、生成される加水分解物量が少なくなり、結果として加水分解物の吸収量の減少に繋がると考えられる。種々の脂肪酸からなる TAG の腓リパーゼによる加水分解に関する報告がある(31)。短鎖飽和脂肪酸や中鎖脂肪酸のみから構成される TAG はオレイン酸からなる TAG よりも加水分解されやすい。長鎖飽和脂肪酸のみからなる TAG は先述のように高融点であるため、腓リパーゼの至適反応温度では固体であり、厳密な加水分解を測定することは困難である。長鎖飽和脂肪酸の腓リパーゼとの反応性は、反応温度での TAG の溶解性が考慮された長鎖飽和脂肪酸と他の脂肪酸からなる TAG の加水分解によって遊離した脂肪酸量で検討した報告がある(31)。融点が 40.8℃の *sn*-1 位にブタン酸(炭素数 4)、3 位にパルミチン酸が結合した TAG を 41℃の反応条件下において腓リパーゼで加水分解した。その時のブタン酸の遊離量は 72 モル%であったのに対し、パルミチン酸は 28 モル%と、パルミチン酸はブタン酸よりも遊離されなかった。用いた TAG の融点から、腓リパーゼの至適反応温度よりも高い反応条件であるものの、加水分解は生じている。また、腓リパーゼは TAG の *sn*-1 あるいは 3 位に結合している脂肪酸を加水分解するが、*sn*-1 位と 3 位のエステル結合を識別しないことが、過去の研究より分かっている(32)。これらから、鎖長の長い飽和脂肪酸は腓リパーゼにより加水分解されにくいと考えられ、長鎖飽和脂肪酸を含む TAG の加水分解は抑制される可能性が示唆される。このような TAG は難消化性を示すと推察される。

グリセロールの特定の位置に特定の脂肪酸を結合させたものを構造脂質と言う(33,34)。低吸収性を目的とした構造脂質がいくつか報告されている。短鎖脂肪酸と長鎖飽和脂肪酸からなるサラトリムや、炭素数 22 のベヘン酸と炭素数 8 のカプリル酸、炭素数 10 のカプリン酸からなる TAG であるカプレニンがあり、これらの摂取による肥満抑制効果も確認されている(35-42)。しかし、リパーゼ阻害剤と同様に、これら構造脂質も脂肪便などの副作用の報告(36)や固体脂であるために調理用途で使用しにくいことがある。

ベヘン酸はピーナッツ油や菜種油などに含まれる長鎖飽和脂肪酸である。先に示したパル

ミチン酸やステアリン酸と同様にベヘン酸は融点が 80°C と非常に高いため、生体内での吸収率は低い。しかし、ベヘン酸とオレイン酸からなる 1,3-dibehenoyl-2-oleoyl-glycerol(BOB) はベヘン酸を含む構造脂質の高融点性を利用し、チョコレート の物性を向上させている(43,44)。BOB の $\beta 2$ 型結晶はカカオ脂の V 型と同様に熱安定性が高く、安定な結晶多形を示すことから、チョコレート用油脂の結晶促進剤として利用されている。BOB を生産する際に、BOB よりも低融点の 1(3)-behenoyl-2,3(1)-dioleoyl-*rac*-glycerol(BOO) などの数種の TAG が副生成物として得られる(45)。ベヘン酸が含まれる副生成物が難消化性であれば、有効性と実用性、生産性のいずれも兼ね備えた構造脂質の開発が出来ると考えられる。しかし、この点に関しては、ほとんど研究がなされていない。

そこで本研究では、肥満の予防・改善に有効で、これまでの構造脂質よりも利用性の高い構造脂質の開発を目指し、次のような検討を行った。第 1 章では、難消化性構造脂質としてのベヘン酸を含む TAG の可能性を、その腓リパーゼによる加水分解特性の観点から検証した。第 2 章では、第 1 章で得られた難消化性構造脂質の生体内での吸収性を確認した。第 3 章では、その難消化性脂質の有効性を動物試験に加えて、ヒトレベルで検証した。最後に第 4 章にて、生体内での難消化性構造脂質の安全性について検討した。

第2章 難消化性構造脂質の検証

長鎖飽和脂肪酸がこれを含むトリアシルグリセロールの加水分解に 与える影響

1. 目的

ベヘン酸を含む TAG の 1 つである BOB は、その物性を活かしてチョコレート用油脂の結晶促進剤として利用されている(43,44)。この生産時に、同じくベヘン酸を含む TAG の 1 つである BOO が副生成物として生成される(45)。

難消化性構造脂質は、膵リパーゼによりそれ自身が加水分解されにくいいため、TAG の加水分解物である脂肪酸と 2-MAG の生成量が少なくなることによって低吸収性を示すと考えられる。その際、TAG に結合する脂肪酸の種類や結合位置の違いが、膵リパーゼによる加水分解に影響を与える要因になると考えられる(46-48)。

本節では、難消化性構造脂質の検証として、BOO を中心とするベヘン酸を含む TAG の難消化性を確認するため、膵リパーゼによる種々のベヘン酸を含む TAG の加水分解速度を *in vitro* の系にて測定した。その際、これまでに報告されているパルミチン酸やステアリン酸を含む TAG と比較検討した。

2. 実験材料および方法

2-1. 実験材料

トリオlein(OOO、Sigma、純度 99%)を全検討のコントロールとした。本検討で用いた TAG

はパルミチン酸、ステアリン酸およびベヘン酸を含む TAG の 15 種類とし、各 TAG は市販の高純度品もしくは不二製油にて調製した。1(3)-Palmitoyl-2,3(1)-dioleoyl-*rac*-glycerol(POO)、1(3),2-distearoyl-3(1)-oleoyl-*rac*-glycerol(SSO) 、 1,3-dioleoyl-2-stearoyl-glycerol(OSO) 、 1(3)-stearoyl-2,3(1)-dioleoyl-*rac*-glycerol(SOO)は Larodan Fine Chemicals AB の試薬を用いた。これら TAG は分取高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を用いて、Table 2-1 に示した条件にて純度 98%以上になるように精製した。

1,3-Dipalmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol(POP)および 1,3-distearoyl-2-oleoyl-*sn*-glycerol(SOS) はココアバター(不二製油)から分画した。以下の反応に使用したベヘン酸エチルエステルは、Formo らおよび Bauer らの方法に基づき、エタノールとベヘン酸(東京化成工業、純度 95%)を硫酸存在下で反応させた(49,50)。1(3),2-Dibehenoyl-3(1)-oleoyl-*rac*-glycerol(BBO)および 1,3-dioleoyl-2-behenoyl-glycerol(OBO)はトリベヘン(東京化成工業、純度 98%)とオレイン酸エチルエステル(東京化成工業、純度 95%)との酵素エステル交換反応にて得た。1,3-Dibehenoyl-2-oleoyl-glycerol(BOB)および 1(3)-behenoyl-2,3(1)-dioleoyl-*rac*-glycerol(BOO)は、ハイオレイックヒマワリ油(不二製油、純度 80%(オレイン酸量として))とベヘン酸エチルエステルとの酵素エステル交換反応にて得た。1(3)-Behenoyl-2,3(1)-dicapryloyl-*rac*-glycerol(BClCl)、1(3)-behenoyl-2,3(1)-dicapryl-*rac*-glycerol(BCnCn)と 1(3)-behenoyl-2,3(1)-dilauroyl-*rac*-glycerol (BLaLa)はそれぞれトリカプリリン(ClClCl、COCNAD-RK、花王、純度 97%)、トリカプリン(CnCnCn、東京化成工業、純度 98%)およびトリラウリン(LaLaLa、東京化成工業、純度 98%)とベヘン酸エチルエステルとの酵素エステル交換反応より得た。1(3)-Behenoyl-2,3(1)-dilinoleoyl-*rac*-glycerol(BLiLi)と 1(3)-behenoyl-2,3(1)-dilinolenoyl-*rac*-glycerol(BLnLn)はハイオレイックサフラワー油(不二製油、純度 78%(リノール酸量として))あるいはエゴマ油(山桂産業、純度 61%(α -リノレン酸量として))とベヘン酸エチルエステルとの酵素エステル交換反応より得た。これら反応油から、分取 HPLC(Waters)を用いて、Table 2-1 に示し

た条件にて各 TAG を純度 98%以上になるように分画した。

すべての TAG について、純度が 98%以上であることを、HPLC(島津製作所)を用いて Table 2-2 に示した条件にて確認した。

2-2. 腓リパーゼによる加水分解反応

腓リパーゼによる TAG の加水分解の測定方法は、Han らの方法を一部改変したものを用いた(51)。80mg の各 TAG、10mg の L- α -ホスファチジルコリン(Sigma)、5mg のタウロコール酸(和光純薬)に 9mL の TES buffer(*1)を加えて、超音波発生装置(KAIJO DENKI)で 1 分間乳化させ、これを基質とした。リパーゼはブタ由来の腓リパーゼ(EC3.1.1.3, Sigma)を使用した。300 μ L の各基質を 15units の腓リパーゼと共に 37°C で 30 分間インキュベートした。その後、3.0mL の抽出液(*2)を加えて 10 秒間攪拌し、1,500 \times g で 10 分間遠心分離した。上清を除去し、1.0mL の銅試薬(*3)を加えて 20 秒間攪拌し、1,500 \times g で 10 分間遠心分離した。上清 1.0mL に 1.5mL の発色試薬(*4)を加えて攪拌し、OD480nm の吸光度を測定した。加水分解速度は、1 時間あたりの反応液中の脂肪酸量として算出した。

(*1)0.1M TES buffer: TES(同人化学) 22.925g、塩化ナトリウム 5.844g を水 900mL に溶解し、1M Tris で pH7.0 に調整後、メスアップした。

(*2)抽出液: クロロホルム: ヘプタン: メタノール=49:49:2 を混合した。

(*3)銅試薬: トリエタノールアミン(キシダ化学)2.98g、硝酸銅(II)三水和物(和光純薬)2.42g、水酸化ナトリウム 0.48g を水 200mL に溶解し、さらに塩化ナトリウム 66g を加えた。

(*4)発色試薬: バソクプロイン(和光純薬)0.2g、ブチルヒドロキシアニソール(ICN Biomedicals)0.1g をクロロホルム 200mL に溶解した。

2-3. 各 TAG の融点測定

各 TAG の融点測定には、示差走査熱量計(Differential Scanning Calorimetry; DSC、Shimadzu DSC-60、島津製作所)を使用した。10mg の各 TAG を液体窒素を用いて、異なる温度条件で-25℃まで冷却し、その後昇温温度 5℃/min で 80℃まで加熱した。最初の吸熱ピークの立ち上がり部分の傾きとベースラインとの交点を融点と定義した。

2-4. 統計解析

データは平均値±標準誤差(SE)で示し、n=5とした。OOOを対照とし、各TAGとの統計解析はOne-way analysis of variance(ANOVA) testを行った($P<0.05$)。多重比較検定としてTukey's HSD testを用いた($P<0.05$)。

3. 結果

3-1. 各 TAG の融点

今回得た各 TAG の融点を Table 2-3 に示した。OOO の融点は 0℃以下であった。今回得た各 TAG は複数の結晶多形を含み、POP と POO の融点はそれぞれ最高 35.4℃、12.4℃であった。またステアリン酸を含む TAG では、SSO の融点は 29.5 から 42.6℃、SOS の融点は 23.5 から 42.0℃、OSO の融点は最高 22.7℃、SOO の融点は 23.1℃であった。ベヘン酸を含む TAG の融点は、それぞれ BBO が 47.2 から 51.4℃、BOB が 38.8 から 50.0℃、OBO が最高 24.9℃、BOO が最高 30.9℃、BClCl が最高 33.9℃、BCnCn が 9.1 から 38.2℃、BLaLa が 22.8 から 45.4℃、BLiLi が最高 12.9℃、BLnLn が最高 9.3℃であった。

3-2. 各 TAG の加水分解速度

パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸とオレイン酸を含む TAG のそれぞれの加水分解速度を Figure 2-1 に示した。OOO の加水分解速度と比較して、パルミチン酸を含む TAG である POP および POO の加水分解速度に有意な差は認められなかった。ステアリン酸を 2 分子含む TAG である SSO や SOS の加水分解速度は、OOO の加水分解速度と比較して有意に低く、OOO の加水分解速度に対して、それぞれ 65.5%、73.3%の抑制率であった。TAG 内のステアリン酸が 1 分子である OSO や SOO の加水分解速度は、OOO のそれと比較して有意に低く、その抑制率はそれぞれ 69.4%と 78.8%であった。ステアリン酸の結合位置あるいは結合数の比較では、SSO、SOS、OSO の間には有意な差は認められなかったが、SOO と SSO との間には有意な差が認められた。

ベヘン酸を 2 分子含む TAG である BBO と BOB それぞれの加水分解速度は OOO よりも有意に低く、OOO に対しそれぞれ 28.8%、31.0%に抑制した。ベヘン酸が 1 分子結合している OBO は OOO よりも加水分解速度が有意に低かったが、その抑制率は 45.5%と BBO や BOB よりも弱かった。同じくベヘン酸が 1 分子結合した BOO の加水分解速度は、OOO と比較して 30.8%と有意に低かった。BOO と同じように 1 分子のベヘン酸が *sn*-1 位に結合した TAG について、*sn*-2 位と 3 位に飽和脂肪酸が結合した BCiCl、BCnCh、BLaLa の加水分解速度は、OOO と比べて有意に低値を示し、それぞれ 37.5%、55.8%、48.0%にまで抑制された。また、*sn*-2 位、3 位に不飽和脂肪酸が結合した BLiLi や BLnLn の加水分解速度も有意に低く、その加水分解速度の抑制は 23.8%、23.4%であった。

ステアリン酸を含む TAG の加水分解速度はパルミチン酸を含む TAG よりも有意に低く、6 割から 8 割に低下した。さらに、ベヘン酸を含む TAG は、これらパルミチン酸やステアリン酸を含む TAG よりも有意に低く、ステアリン酸よりも 4 割から 5 割の抑制が確認された。

4. 考察

本節では、ベヘン酸を含む TAG の加水分解速度を測定し、これらが難消化性構造脂質となり得るかを検証した。その結果、ベヘン酸を含む TAG はパルミチン酸やステアリン酸を含む TAG よりも自身の加水分解速度が有意に低く、飽和脂肪酸の鎖長が長いほど加水分解速度が抑制されると考えられた(Figure 2-1)。長鎖飽和脂肪酸の鎖長が長くなるにしたがって、それを含む TAG の融点は高かったが、Entressangles らは、融点の高い固体脂は腓リパーゼが基質と認識しないことを報告している(31)。長鎖飽和脂肪酸が TAG 内に 2 分子結合している場合、POP や SOS よりも BOB の融点は高く(Figure 2-2)、より鎖長の長い長鎖飽和脂肪酸が結合することによる TAG の高融点性が、ベヘン酸を含む TAG の加水分解速度の抑制の要因と考えられた。

パルミチン酸、ステアリン酸、ベヘン酸が 1 分子結合した TAG の多くは融点が 37℃よりも低い(Figure 2-2)、パルミチン酸やステアリン酸よりもベヘン酸を含む TAG で、その加水分解速度は有意に抑制された(Figure 2-1)。つまり、TAG の融点だけがベヘン酸を含む TAG の加水分解速度の抑制に関与しているのではないと推察された。Kanjilal らは、ベヘン酸とリノール酸からなる 1(3)-Behenoyl-2,3(1)-dilinoleoyl-glycerol を主成分とする構造脂質の吸収率が低いことを報告している(52)。加水分解された遊離のベヘン酸が極めて水に溶解されにくいいため、遊離ベヘン酸が他の TAG と腓リパーゼとの加水分解を妨げてしまい、胆汁酸ミセルへの脂肪酸の溶解量を減少させると考察されている。ベヘン酸のような直鎖の長鎖飽和脂肪酸が 1 分子だけ結合する TAG の特徴的な立体構造が、加水分解速度の抑制につながったと示唆された。

ベヘン酸が結合した TAG の加水分解速度は、OOO、パルミチン酸やステアリン酸を含む TAG のそれよりも抑制されることが明らかとなったが、興味深いことに *sn*-1(3)位にベヘン酸が結合した TAG の加水分解速度の抑制は、それを構成する残りの脂肪酸の影響を受けることが

分かった(Figure 2-1)。不飽和脂肪酸が結合した TAG は、分子内にある二重結合が立体障害となって、腓リパーゼによるその TAG の加水分解が抑制される(46-48)。ベヘン酸を含む TAG の加水分解速度の抑制には、このような不飽和脂肪酸が結合することによる立体障害も含め、立体構造上の特異性が大きく関係しているものと考えられる。

以上より、パルミチン酸やステアリン酸を含む TAG よりもベヘン酸が 1 分子以上結合した TAG において、その TAG の加水分解速度が抑制され、特にベヘン酸と不飽和脂肪酸からなる TAG、BOO・BLiLi・BLnLn で顕著な抑制が得られることが確認された。加水分解の速度が遅いことは加水分解されにくいことを示唆し、ベヘン酸と不飽和脂肪酸からなる TAG は難消化性構造脂質であることが示された。食品用途として利用可能な難消化性構造脂質には、汎用性から融点が 37℃以下であること、様々な食品形態に利用しやすいよう少量の使用であること、食経験のある天然油脂であること、さらに食品工業として生産性の高い TAG であることが望ましい。BOO・BLiLi・BLnLn のうち、BOO の融点は 30.9℃であり、顕著な難消化性を示した。さらに、BOO はピーナッツ油に含まれ、またチョコレート用油脂の結晶促進剤である BOB の製造時の主たる副原料であるという点から、BOO を難消化性構造脂質の候補とした。

Table 2-1 Analytic conditions of preparative HPLC

| conditions | |
|------------------|---------------------------------|
| Column | SunFire C18(5φ、50mm×250mm) |
| Solvent | acetone/acetonitrile=80/20(v/v) |
| Carrier velocity | 1.1mL/min |

Table 2-2 Analytic conditions of HPLC

| conditions | |
|------------------|--|
| Column | LiChrosorb RP-18-5(5φ、4.6mm×250mm) (GL Science) A-303 ODS(5φ、4.6mm×250mm) (Yamamura Chemical) |
| Solvent | acetone/acetonitrile=80/20(v/v) |
| Carrier velocity | 0.9mL/min |

Table 2-3 Melting points of each TAG

| TAG species | Melting point [°C] |
|-------------|---------------------|
| OOO | Below 0 |
| POP | At the highest 35.4 |
| POO | At the highest 12.4 |
| SSO | 29.5-42.6 |
| SOS | 23.5-42.0 |
| OSO | At the highest 22.7 |
| SOO | At the highest 23.1 |
| BBO | 47.2-51.4 |
| BOB | 38.8-50.0 |
| OBO | At the highest 24.9 |
| BOO | At the highest 30.9 |
| BClCl | At the highest 33.9 |
| BCnCn | 9.1-38.2 |
| BLaLa | 22.8-45.4 |
| BLiLi | At the highest 12.9 |
| BLnLn | At the highest 9.3 |

O; oleic acid, P; palmitic acid, S; stearic acid, B; behenic acid,

Cl: caprylic acid, Cn; capric acid, La; lauric acid,

Li; linoleic acid, Ln; α -linolenic acid

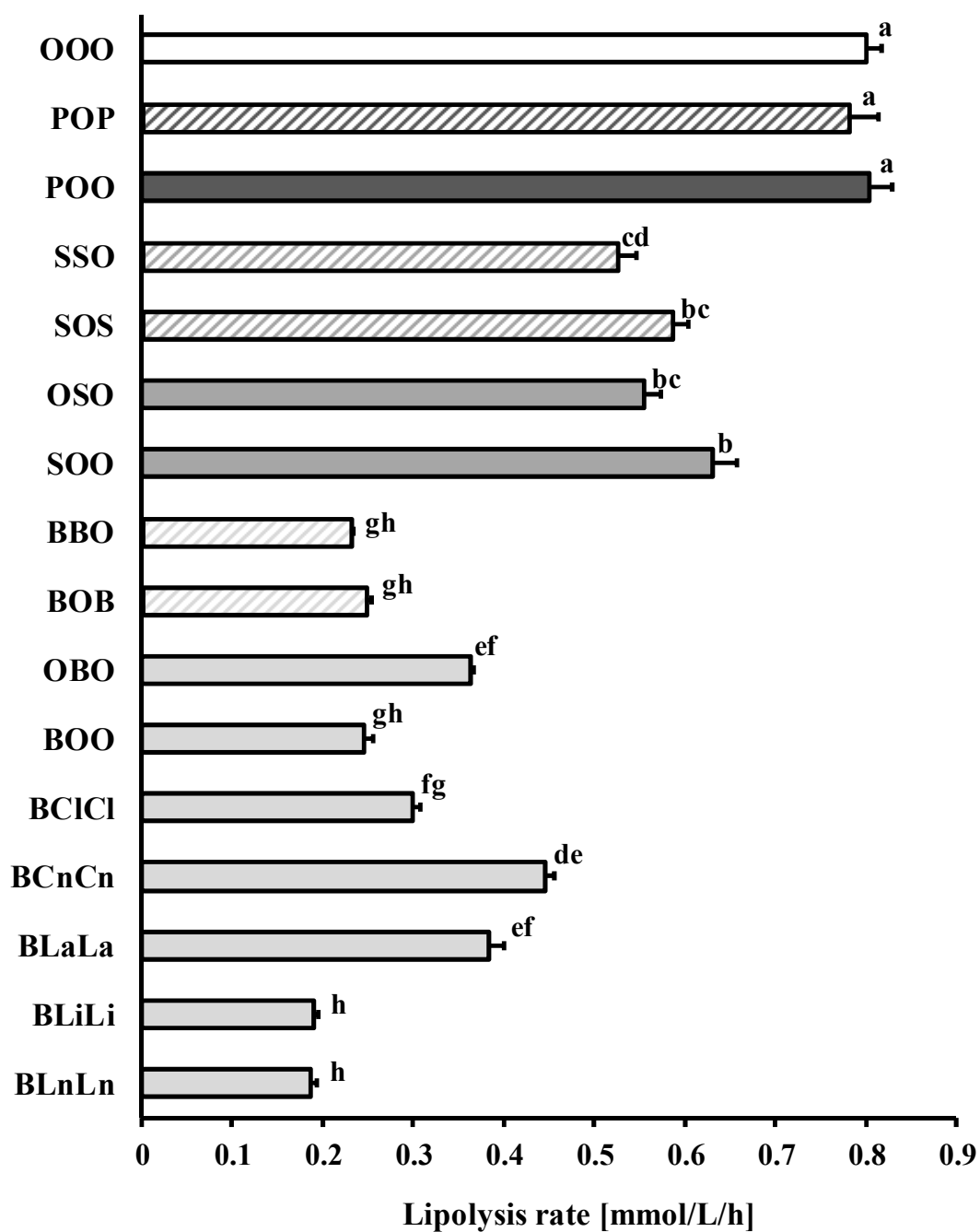


Figure 2-1 Lipolysis rates of each TAG containing long chain saturated fatty acid

Values are means \pm SE, n=5. Different letters represent significant differences among each TAG ($P<0.05$).

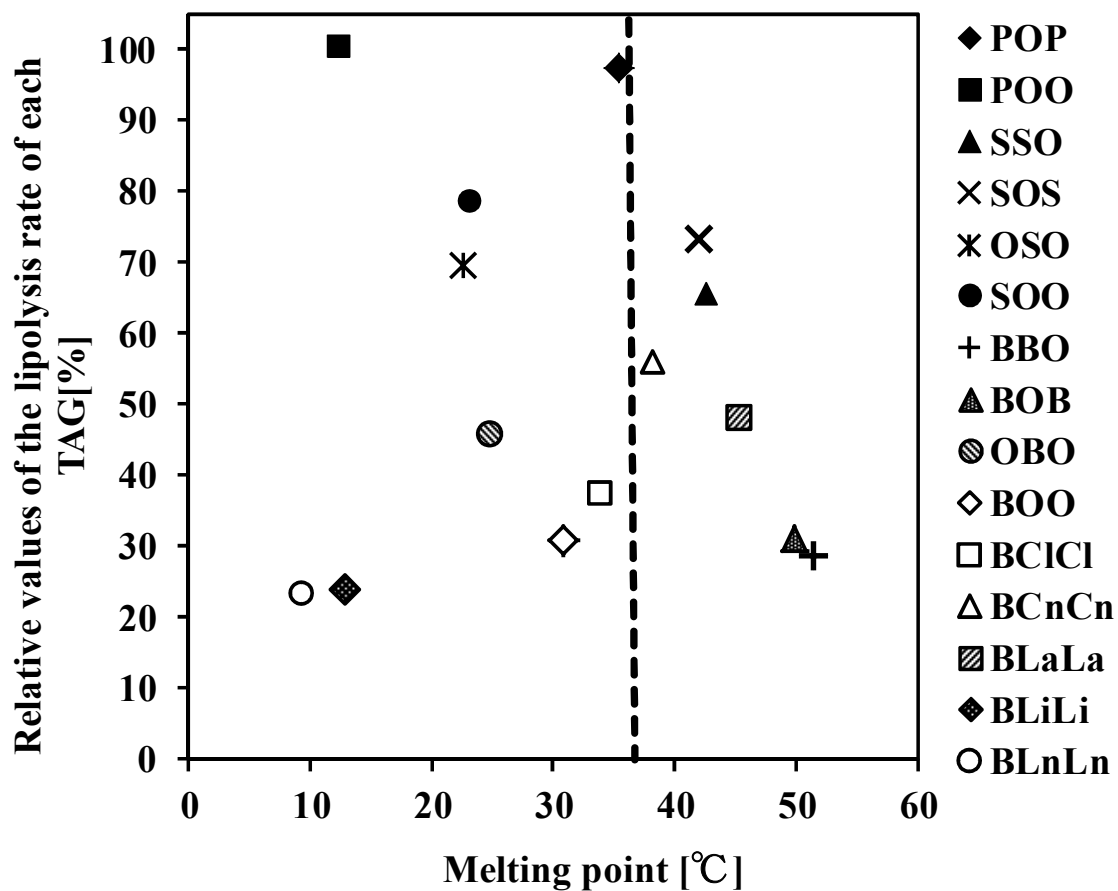


Figure 2-2 Relationship between the melting point and the lipolysis rate of each TAG

--- line at 37°C

100% as the lipolysis rate of OOO, relative evaluated the lipolysis rate of each TAG.

第3章 難消化性構造脂質 1(3)-behenoyl-2,3(1)-dioleoyl-*rac*-glycerol

(BOO)の胸管リンパへの吸収性の検証

第1節 BOO の胸管リンパへの吸収性の評価

1. 目的

ベヘン酸を含む構造脂質であるカプレニン[®]は、ベヘン酸の生体への吸収率が低いことで、低吸収性が得られることが報告されている(38-42)。BOO もこの構造脂質と同様に生体への吸収率が低いと推察され、その作用にはベヘン酸の低吸収性が関与すると考えられる。

前章の *in vitro* の検討から、ベヘン酸を含む TAG の腓リパーゼによる加水分解が抑制されることが確認された。そして、ベヘン酸を含む TAG の加水分解抑制作用と汎用性、食品工業の生産性から、BOO が難消化性構造脂質として実用性の高い TAG であると考えられた。

摂取した TAG の生体内での吸収性は、胸管リンパ液に含まれる TAG や脂肪酸を測定することで確認することが出来る。そこで、BOO をラットに投与した時のリンパ液中のオレイン酸およびベヘン酸を測定し、BOO の生体での吸収性を検討した。難消化性構造脂質の汎用性の観点より、BOO の少量添加による低吸収性を評価するため、本検討では対照の TAG である OOO の 10%を BOO に置換した系で行うこととした。

2. 実験材料および方法

2-1. 実験材料

2-1-1. 投与用 TAG の調製

今回検討する TAG は、コントロール群に OOO(Sigma)、試験群に BOO を用いた。BOO は第 2 章 2-1-2 と同じ方法で得た高純度 BOO を使用した。今回使用した BOO の純度は 98% であった。

2-1-2. 投与エマルションの調製

投与エマルションの組成を Table 3-1-1 に示す。投与液は超音波ホモジナイザー(Sonifier Model 250, Branson Ultrasonics Corporation)を用いてエマルション化した。なお、投与エマルションの調製は投与直前に行った。

2-2. 胸管リンパカニューレーションの施術およびアフターケア

本検討は、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」に従って試験計画を策定し、実施した。

2-2-1. 実験動物および予備飼育

8 週齢 Sprague-Dawley 系雄性 Specific-pathogen-free ラット(日本クレア)を用いた。各ラットは室温 21-25℃、明暗サイクル 08:00-20:00 の環境下、ステンレスケージで個別飼育を行った。各ラットは CE-2(日本クレア)を用いて 4 日間予備飼育した。

2-2-2. 胸管リンパカニューレーションの施術

各ラットにネンブタールを腹腔内投与し(0.1% v/w 体重)、麻酔した。開腹後、胸管にリンパチューブ(single lumen clear vinyl tube SV-35(夏目製作所))を挿入した。また、胃には胃チューブ(single lumen polyethylene tube SP-55(夏目製作所))を装着した。手術後、ラットをリストレイニングケージに入れ、保温しながら一晩回復させた。実験期間中は 139mM グルコース-85 mM 塩化ナトリウムを含む等張液を飲水させた。また、胃チューブより同等張液をシリンジポンプ(Harvard apparatus)を使って 3.4mL/h で注入した。施術後はラットの状態を随時確認し、リンパチューブ内にフィブリンが生成した時はその都度除去した。

2-3. 投与およびリンパ液の回収

施術翌朝、リンパ液中の内因性の脂肪酸を確認するために、ブランク液として投与前2時間のリンパ液を採取した。このリンパ液量を基に、OOO群とBOO群の2群に群分けを行った。その後、2-1-2の方法で調製した投与液を胃チューブより3mL/匹注入した。続いて、139mM グルコース-85mM 塩化ナトリウムを含む等張液を胃チューブより注入し、投与液を完全に胃内に注入した。

投与後 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8 および 24 時間に得られたリンパ液をメスシリンダーに全量採取した。その際、リンパ液の凝固を防ぐために、600 μ L(8 時間までの毎時間)および 1500 μ L(8 時間から 24 時間まで)の EDTA-2Na 溶液(100mg/mL)を予めメスシリンダーに添加した。採取したリンパ液は転倒混和してから、15mL プラスチックチューブに移して保存した。各時間帯のリンパ液量を基に、0 から 24 時間のリンパ液を再構成し、分析結果の参考値とした。なお、採取したリンパ液は、分析時まで-35℃で冷凍保存した。

2-4. 投与液およびリンパ液中の脂肪酸分析

投与液およびリンパ液の脂肪酸分析フローを Figure 3-1-1 に示した。投与液およびリンパ液からの脂肪の抽出は Folch 法で行った(53)。50 μ L の投与液に 4mL のメタノール、2mL の 1mg/mL ペンタデカン酸(Alfa Aesar、内部標準、クロロホルム溶液)、6mL のクロロホルムを加えて 40℃で 30 分間インキュベートした。また、リンパ液サンプル 0.5mL には 4mL のメタノール、1mL の 0.2mg/mL ペンタデカン酸、7mL のクロロホルムを加えて、投与液と同様にインキュベートした。インキュベート中は 10 分おきに転倒混和した。2.4mL の水を加えて、3,000rpm で 5 分間遠心分離した。上層を除去した後、溶媒を乾固した。そこに 4mL の 3 フッ化ホウ素メタノール錯体を加えて、80℃で 120 分間トランスメチル化した。水冷した後、4mL の水を加え、3mL のヘキサンにて脂肪酸を抽出した。5 分間振とうしてから 3,000rpm で 5 分間遠心分離し、上層

をガスクロ用チューブに移して乾固した。下層はさらに2回抽出を繰り返し、その都度上層を移してヘキサンを乾固した。これをガスクロマトグラフィーに供した。ガスクロマトグラフィーはGC-2014(島津製作所)を用いて、Table 3-1-2 に示した条件で測定した。リンパへのオレイン酸およびベヘン酸の吸収率は次に示した計算式より算出した。

＜脂肪酸の回収率の計算式＞

■投与液に含まれる脂肪酸量

$$W \text{ [mg/3mL]} = A \times C / B \times 3 / a$$

■脂肪酸の回収率

●-2から0時間のリンパ液中の1時間あたりの脂肪酸量

$$T \text{ [mg/h]} = A \times C / B \times L / b / 2$$

●各時間のリンパ液中の脂肪酸の回収率

0から6時間までの各時間における脂肪酸の回収率

$$X \text{ [%]} = (A \times C / B \times L / b - T \times 1) / W \times 100$$

6から8時間までの2時間における脂肪酸の回収率

$$Y \text{ [%]} = (A \times C / B \times L / b - T \times 2) / W \times 100$$

8から24時間までの16時間における脂肪酸の回収率

$$Z \text{ [%]} = (A \times C / B \times L / b - T \times 16) / W \times 100$$

A: 脂肪酸のエリア面積[%]

B: ペンタデカン酸のエリア面積[%]

C: ペンタデカン酸の添加量[mg]

a: 投与液のサンプリング量[mL]

L: リンパ液量[mL]

b: リンパ液のサンプリング量[mL]

2-5. 統計解析

データは平均値±SE で示した。各時間におけるリンパへの総脂肪酸、オレイン酸およびベヘン酸の回収率についての統計解析は Student's *t*-test で行った($P < 0.05$)。

3. 結果

3-1. リンパ液量

いずれの時間においても、リンパ流量は2群間で有意な差は認められなかった(Table 3-1-3)。

3-2. リンパ液中の総脂肪酸、オレイン酸、ベヘン酸の回収率

ベヘン酸およびオレイン酸を合わせた総脂肪酸のリンパ液中の回収率は、投与後1, 2, 3, 4時間において、OOO群よりもBOO群で低く推移し、投与後5時間ではOOO群75.3%に対してBOO群60.3%と有意に低かった(Figure 3-1-2)。さらに、投与後6時間においても、OOO群80.6%に対してBOO群65.5%と、BOO群の総脂肪酸の回収率は有意に低かった。投与後24時間における総脂肪酸の回収率は、2群間で有意な差は認められなかった。

BOO群のベヘン酸の回収率は、投与後2時間で32.5%、投与後8時間で63.4%、投与後24時間においても72.3%と、投与したベヘン酸のすべてを吸収していなかった(Figure 3-1-3)。さらに、OOO群のオレイン酸の回収率は、投与後2時間では47.9%、8時間で88.7%、24時間で104.5%であり、これらと比較して、BOO群のベヘン酸の回収率はすべての時間において有意に低かった。また、BOO群のベヘン酸の回収率は、同じBOO群のオレイン酸の回収率よりも低く推移し、投与後6時間でのBOO群のオレイン酸回収率が66.0%に対してベヘン酸の回収率が55.1%、投与後24時間でのBOO群のオレイン酸回収率が100%に対してベヘン酸の回収率が72.3%と、BOO群のベヘン酸の回収率の方がオレイン酸よりも有意に低かった。

OOO群のオレイン酸と比較して、BOO群のオレイン酸の回収率は、投与後4時間まで低く推移した(Figure 3-1-3)。投与後5時間において、OOO群75.3%に対してBOO群60.7%と、さらに投与後6時間では、OOO群80.6%に対してBOO群66.0%と、両時間におけるBOO群

のオレイン酸の回収率は有意に低かった。投与後 24 時間におけるオレイン酸の回収率は、OOO 群、BOO 群との間に有意差は認められなかった。

4. 考察

BOO 投与によるリンパでのベヘン酸の吸収率は投与後 24 時間でも 72.3%と、投与したベヘン酸すべてを吸収していなかったことから、BOO 自身の吸収が低いことを示した(Figure 3-1-2, 3-1-3)。これは腓リパーゼによる BOO の加水分解が抑制されたためと考えられた。ベヘン酸を含むカブレニン投与時のリンパでのベヘン酸の吸収率は 11.2%、同じくベヘン酸を含むピーナッツ油投与では 55.4%と報告されており(39,54)、BOO は他のベヘン酸を含む食事油脂よりもベヘン酸の吸収率が高かった。Ikeda らは、リンパでのステアリン酸の吸収率は共に投与した食事油脂の脂肪酸組成の影響を受け、不飽和脂肪酸の割合が多くなるほど、ステアリン酸の吸収が上昇することを報告している(55)。また、Yagi らの 1(3)-Stearoyl-2,3(1)-dilinoleoyl-glycerol と 2-linoleoyl-1,3-distearoyl-glycerol を用いたリンパ吸収試験および Vistisen らの 1,3-dicapryloyl-2-oleoyl-glycerol と OOO を用いたリンパ吸収試験においても、不飽和脂肪酸量に依存して飽和脂肪酸の吸収率が高まる傾向が得られている(56,57)。これらより、BOO も同様にオレイン酸の存在によりベヘン酸の吸収率が高まったと推察される。

BOO 群の OOO 由来のオレイン酸の吸収率を次のように計算した。各時間で得られた BOO 群のリンパ液に含まれるベヘン酸のモル量の 2 倍量を BOO 群における BOO 由来のオレイン酸の吸収量と仮定した。そして、BOO 群のリンパ液に含まれる総オレイン酸量から、BOO 由来のオレイン酸量を差し引いたものを、BOO 群の OOO 由来のオレイン酸とした。その結果、BOO 群の OOO 由来のオレイン酸の吸収率は OOO 群のオレイン酸よりも有意に低下することが明らかとなった(Figure 3-1-4)。BOO が単に低吸収性の構造脂質であれば、OOO 由来のオ

レイン酸の吸収率はコントロール群と同等と考えられる。しかし、この吸収率が BOO 群で低下したことは、BOO が共存する OOO の吸収をも抑制する可能性があることを示唆している。

BOO が共存する OOO の吸収を抑制した理由について、膵リパーゼによる OOO の加水分解に対し、BOO の存在がその障害となっている可能性が考えられる。第 1 章の結果から、BOO は加水分解されにくい、すなわち BOO を加水分解するのに時間を要すると考えられる。ヒトにおいて、分泌される膵液は 1 日 1500mL 前後で、膵リパーゼはこの 3%程度を占める(58)。食事を摂取した後も、過剰な膵リパーゼの分泌は起こらないとされている(59)。このことから、膵リパーゼが BOO の加水分解に時間がかかる分、OOO と接触する膵リパーゼ量が少ないことで、OOO と接触するまでに時間がかかることにより、OOO の加水分解が低下したものと考えられる。このような作用を持つ構造脂質はこれまでに報告されておらず、BOO に特長的な作用であると言える。

Table 3-1-1 Compositions of test emulsions

| [mg/rat] | OOO | BOO |
|--------------------------------------|------|------|
| OOO | 200 | 180 |
| BOO | - | 20 |
| Fatty acid free albumin ¹ | 50 | 50 |
| Sodium taurocholate ² | 200 | 200 |
| Water [mL] | 2.78 | 2.78 |

¹ Wako Pure Chemical² Nacalai Tesque

Table 3-1-2 Analytic conditions of gas chromatography

| conditions | |
|------------------|---|
| Column | capillary column (ULBON HR-SS-10, GL Science) (0.25mm×50mm) |
| Carrier velocity | nitrogen 50mL/min |
| Temperature | 180-220°C |
| Detector | flame ionization detector |

Table 3-1-3 Lymph flows

| [mL] | OOO | BOO |
|-----------------------------------|-------------|------------|
| Before administration (-2 to 0 h) | 11.0 ± 1.8 | 12.6 ± 1.0 |
| 0 to 1 hour | 5.5 ± 0.4 | 4.8 ± 0.4 |
| 1 to 2 hour | 7.7 ± 0.8 | 7.8 ± 0.6 |
| 2 to 3 hour | 7.0 ± 1.2 | 6.9 ± 0.8 |
| 3 to 4 hour | 6.8 ± 1.5 | 5.6 ± 0.8 |
| 4 to 5 hour | 5.2 ± 0.8 | 5.8 ± 0.7 |
| 5 to 6 hour | 7.4 ± 1.2 | 6.3 ± 0.9 |
| 6 to 8 hour | 11.9 ± 1.6 | 12.4 ± 1.6 |
| 8 to 24 hour | 96.4 ± 12.1 | 110 ± 10 |

Values are means±SE, n=5(OOO group), n=7(BOO group).

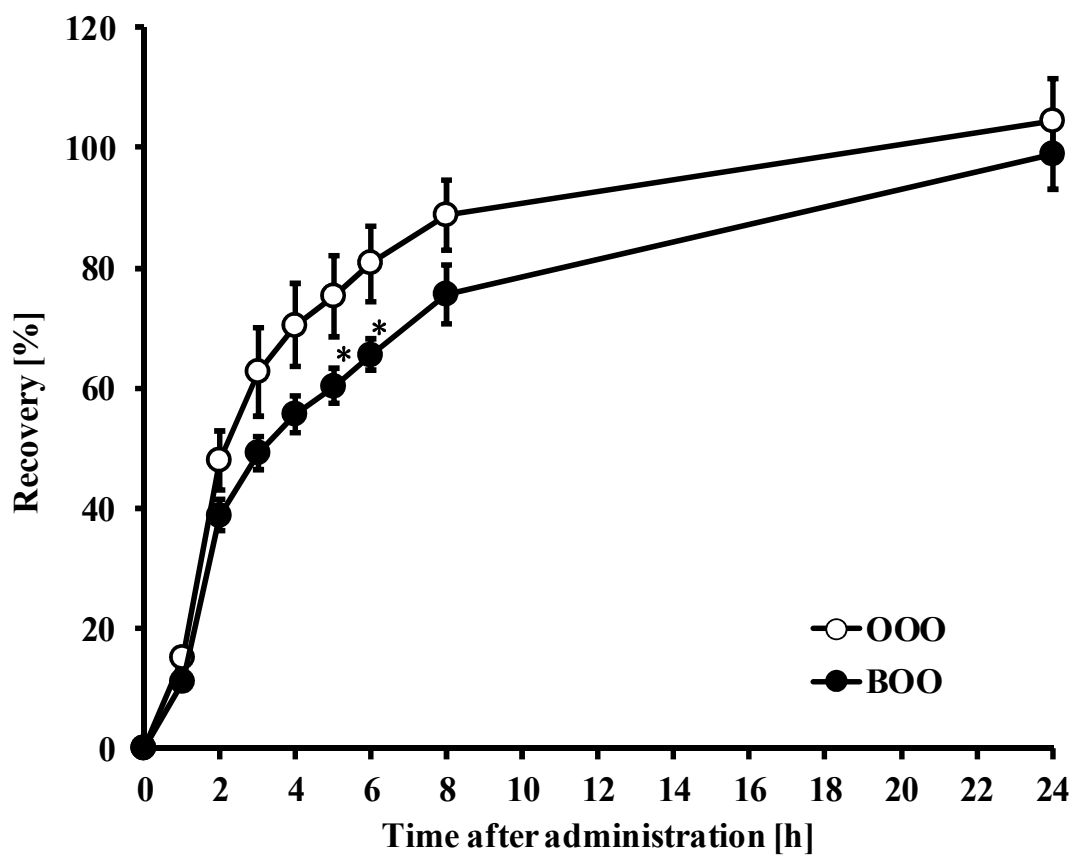


Figure 3-1-2 Effect of BOO on lymphatic recovery of oleic and behenic acids in rats receiving intragastric administration of fat emulsions.

Values are means \pm SE, n=5(OOO group), n=7(BOO group). * indicates significant differences in corresponding values in rats that were administered the OOO emulsion (Student's *t*-test, $P<0.05$).

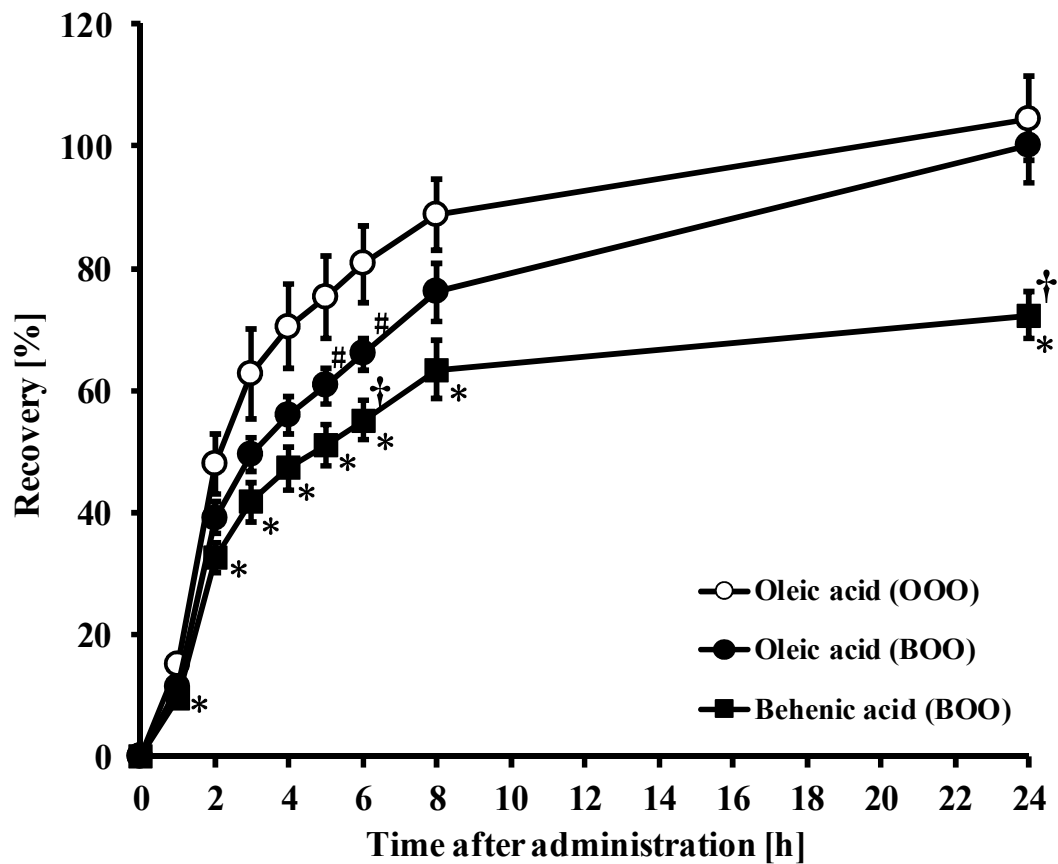


Figure 3-1-3 Effect of BOO on lymphatic recovery of each fatty acid in rats receiving intragastric administration of fat emulsions.

Values are means \pm SE, $n=5$ (OOO group), $n=7$ (BOO group). * indicates significant differences in corresponding values of behenic acid absorption in the OOO group (Student's t -test, $P<0.05$).

† indicates significant differences in corresponding values of oleic acid absorption in the BOO group (Student's t -test, $P<0.05$). # indicates significant differences in corresponding values of oleic acid absorption in the OOO group (Student's t -test, $P<0.05$).

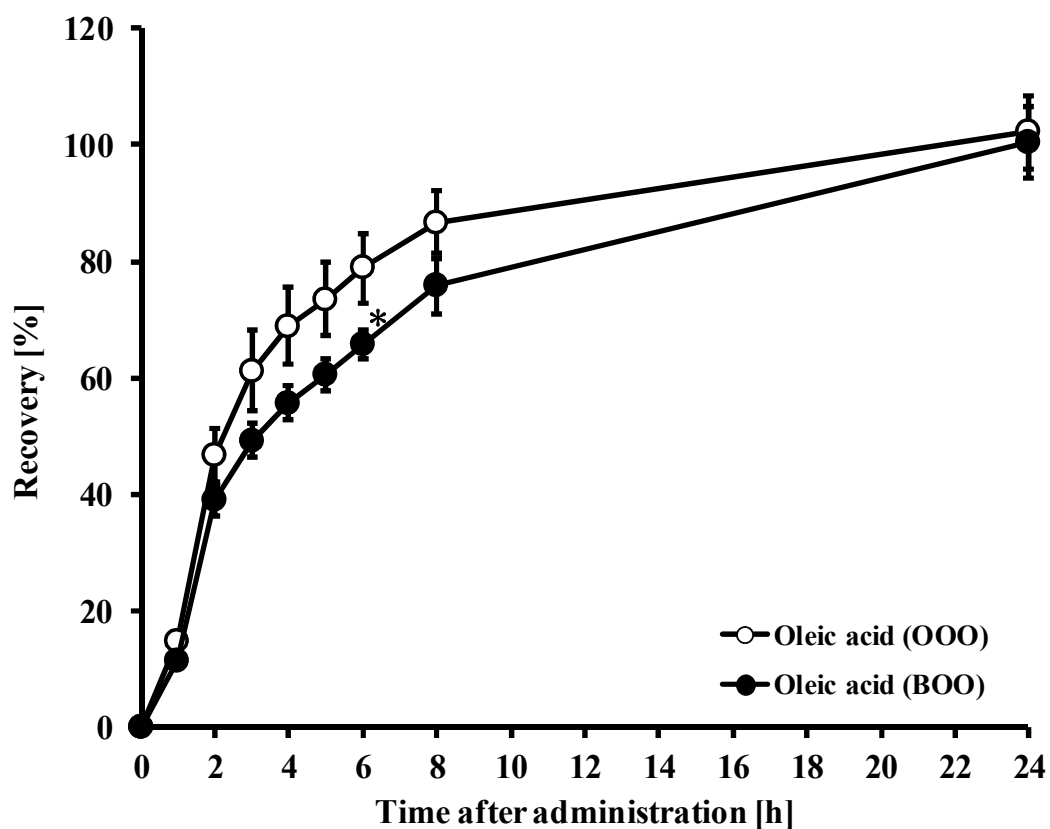


Figure 3-1-4 Effect of BOO on calculated lymphatic recovery of oleic acid from OOO in rats receiving intragastric administration of fat emulsions.

Values are means \pm SE, n=5(OOO group), n=7(BOO group). * indicates significant differences in corresponding values in rats that were administered the OOO emulsion (Student's *t*-test, $P<0.05$).

第3章 第2節 BOO が他のトリアシルグリセロールのリンパ吸収に

与える影響

1. 目的

前節の結果から、BOO は自身の吸収が低く、さらに共存する OOO の吸収を抑制する可能性が考えられた。しかしながら、前節の方法では、リンパ液に吸収されたオレイン酸が OOO 由来であるか、BOO 由来であるかの区別をすることが出来ない。TAG の吸収を正確に測定するには、ラジオアイソトープでラベルした脂肪酸を含む TAG を用い、この TAG 由来の脂肪酸の吸収を詳細に見る方法がある。そこで、 ^{14}C で標識したオレイン酸からなる OOO(^{14}C -OOO)を BOO と同時に投与し、リンパ液中の ^{14}C -OOO 量を測定することで、BOO がリンパでの共存する OOO の吸収に与える影響を調べた。

2. 実験材料および方法

2-1. 実験材料

2-1-1. 投与用 TAG の調製

今回検討する TAG はコントロール群に OOO(Sigma)、試験群に BOO を用いた。BOO は第2章 2-1-2 と同じ方法で得た高純度 BOO を用いた。今回使用した BOO の純度は 98%であった。 ^{14}C -OOO は tri[1- ^{14}C]oleoylglycerol(PerkinElmer)を用いた。

2-1-2. 投与エマルジョンの調製

投与エマルジョンの組成を Table 3-2-1 に示す。投与液は第 3 章第 1 節 2-1-2 と同様の方法で調製した。なお、投与エマルジョンの調製は投与直前に行った。

2-2. 胸管リンパカニューレーションの施術およびアフターケア、投与、リンパ液の回収

本検討は、「国立大学法人東北大学における動物実験等に関する規程」に従って試験計画を策定し、実施した。実験動物、予備飼育、胸管リンパカニューレーションの施術、投与およびリンパ液の回収は、すべて第 3 章第 1 節 2-2 および 2-3 に示した方法と同様に実施した。

2-3. リンパ液中の ^{14}C -OOO の分析

投与液 50 μL もしくはリンパ液 1mL を液体シンチレーションカウンター用バイアル瓶に取り、10mL のシンチレーションカクテル(ACS-II、Amersham Biosciences)を加えて、浮遊物がなくなるまで攪拌した。サンプルを一晩静置した後、液体シンチレーションカウンター(Aloka)で ^{14}C の蛍光量を測定した(測定時間:5 分)。投与液およびリンパ液の ^{14}C -OOO の測定値とリンパ液量から、各時間の ^{14}C -OOO の回収率を算出した。

2-4. 統計解析

データは平均値 \pm SE で示した。各時間におけるリンパ液中の ^{14}C -OOO の回収率についての統計解析は Student's *t*-test で行った($P<0.05$)。

3. 結果

3-1. リンパ液量

各時間におけるリンパ液量に、2 群間で有意な差は認められなかった(Table 3-2-2)。

3-2. リンパ液中の ^{14}C -OOO の回収率

投与後 4 時間まで、OOO 群と比較して BOO 群で ^{14}C -OOO の回収率は低く推移した (Figure 3-2-1)。投与後 5 時間での OOO 群は 79.8%に対して BOO 群は 63.4%、6 時間での OOO 群は 84.0%に対して BOO 群は 68.8%と、両時間において BOO 群で有意に低かった。投与後 8 時間において、引き続き BOO 群の低い傾向は認められたが、投与後 24 時間では 2 群間で有意な差は認められなかった。

4. 考察

BOO が共存する OOO の吸収に及ぼす影響を、 ^{14}C -OOO を用いた胸管リンパカニューレーション法で検討した。BOO 共存下において、リンパへの ^{14}C -OOO の吸収が有意に低下したことから、BOO が共存する OOO の吸収を抑制すると考えられた (Figure 3-2-1)。前節 Figure 3-2-4 より、投与後 8 時間における OOO 群のオレイン酸の吸収と BOO 群の想定した OOO 由来のオレイン酸の吸収差は 10.9%であり、今回の結果では OOO 群のオレイン酸との吸収率の差は 11.7%とほぼ一致しており、前節の推察を裏付ける結果であった。

本節における ^{14}C -OOO の吸収率について、投与後 8 時間までは OOO 群よりも BOO 群で低かったが、投与後 24 時間ではその差は認められなかった。同様の結果は、前節 Figure 3-2-4 で示した BOO 群の OOO 由来のオレイン酸の吸収率においても認められている。前節 Figure 3-2-2 で得られた総脂肪酸の吸収率は、投与後 24 時間では有意差はないものの、BOO 群で 5.6%低かった。この低下は、BOO 自身の吸収抑制であると考えられる。これら結果より、BOO は共存する OOO の吸収を阻害するのではなく、遅延させる作用を有することが示唆される。

5. 小括

BOO 投与において、リンパでのベヘン酸の吸収が有意に低かったことから、他の低吸収性構造脂質と同様に BOO も低吸収性であることが示された。これは、腓リパーゼによる BOO の加水分解が抑制されたことに起因すると考えられる。さらに、BOO 共存下における ^{14}C -OOO の吸収の有意な低下から、BOO は共存する OOO の吸収を遅延・抑制させることを明らかにした。この結果は BOO が共存する OOO の加水分解を阻害しているためであると考えられる。つまり、BOO は自身の加水分解抑制による低吸収性だけではなく、共存する OOO の加水分解の阻害による OOO の吸収を遅延あるいは抑制するという、これまでの低吸収性油脂とは異なるメカニズムによって、食事油脂の吸収抑制作用が得られることが示唆された。

Table 3-2-1 Compositions of test emulsions

| [mg/rat] | OOO | BOO |
|--------------------------------------|------|------|
| OOO | 200 | 180 |
| BOO | - | 20 |
| ¹⁴ C-OOO ¹ | 1μCi | 1μCi |
| Fatty acid free albumin ² | 50 | 50 |
| Sodium taurocholate ³ | 200 | 200 |
| Water [mL] | 2.78 | 2.78 |

¹ tri[1-¹⁴C]oleoylglycerol, PerkinElmer

² Wako Pure Chemical

³ Nacalai Tesque

Table 3-2-2 Lymph flows

| [mL] | OOO | BOO |
|--------------|-----------------|----------------|
| 0 to 1 hour | 5.9 \pm 0.3 | 4.9 \pm 0.3 |
| 1 to 2 hour | 7.2 \pm 0.4 | 6.8 \pm 0.5 |
| 2 to 3 hour | 7.1 \pm 0.2 | 5.8 \pm 0.5 |
| 3 to 4 hour | 5.1 \pm 0.2 | 4.9 \pm 0.5 |
| 4 to 5 hour | 4.3 \pm 0.4 | 4.6 \pm 0.4 |
| 5 to 6 hour | 4.8 \pm 0.4 | 4.2 \pm 0.3 |
| 6 to 8 hour | 10.1 \pm 0.9 | 9.6 \pm 1.0 |
| 8 to 24 hour | 81.4 \pm 10.1 | 67.8 \pm 8.3 |

Values are means \pm SE, n=5 (OOO group), n=6 (BOO group).

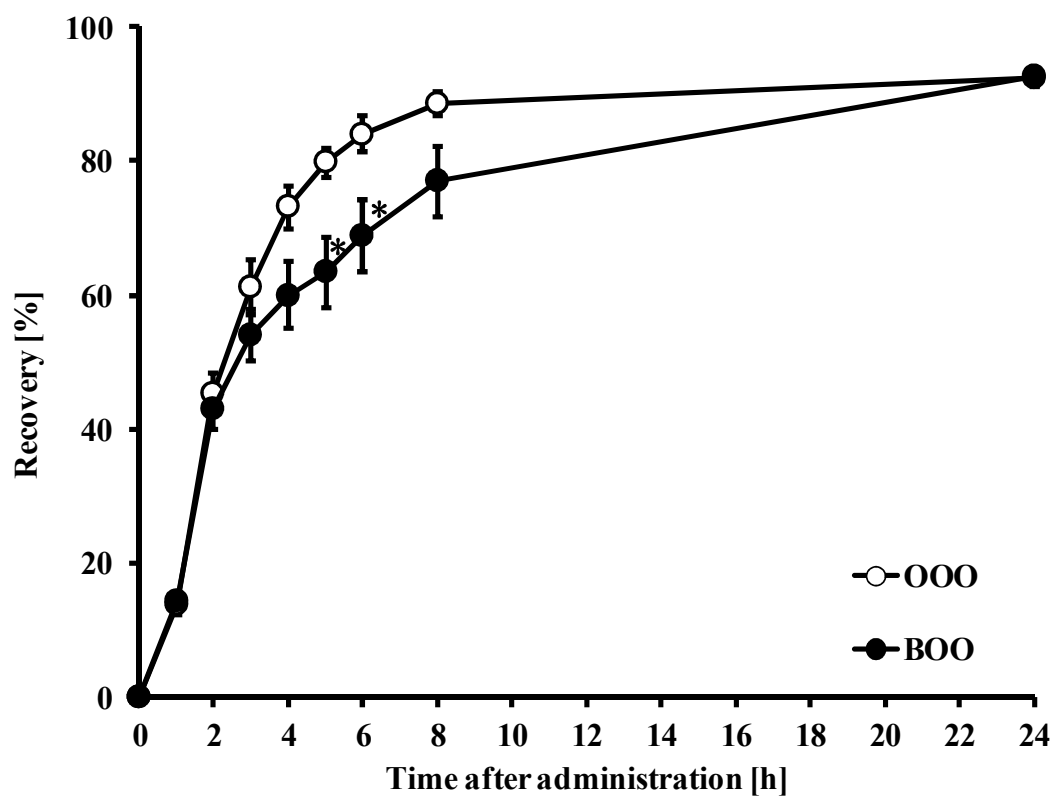


Figure 3-2-1 Effects of BOO on lymphatic recovery of ^{14}C -OOO in rats receiving intragastric administration of fat emulsions.

Values are means \pm SE, n=5(OOO group), n=6(BOO group). * indicates significant differences in corresponding values of ^{14}C -OOO absorption in rats that administered the OOO emulsion (Student's *t*-test, $P<0.05$).

第4章 難消化性構造脂質 BOO の有効性の検証

第1節 BOO 摂取によるラットでの血中および肝臓トリアシルグリセロール、 内臓脂肪、脂肪排泄に与える影響

1. 目的

食事油脂中に BOO が含まれることで、リンパでの BOO の吸収が抑制されるだけでなく、共存する TAG の吸収を遅延あるいは抑制させることが明らかとなった。リンパでの TAG の吸収を遅延・抑制する茶カテキンやウーロン茶重合ポリフェノールには、食後の TAG 濃度の上昇抑制効果、さらに血中 TAG 濃度の低下や内臓脂肪の減少効果が認められている(22,25)。BOO 摂取による食後血清 TAG 濃度上昇抑制効果についてはヒトで報告されており(60)、BOO においても血中 TAG 濃度の低下や内臓脂肪の蓄積の抑制が期待できる。そこで、本節では BOO 摂取による脂質代謝や抗肥満に与える影響を検討した。

2. 実験材料および方法

2-1. BOO 高含有油脂の作製

第2章 2-1 で BOO を得るために調製した、ハイオレイックヒマワリ油とベヘン酸エチルエステルとの酵素エステル交換反応油を粗 BOO 高含有油脂とした。粗 BOO 高含有油脂を 200℃ で 30 分間減圧蒸留した後、ヘキサンに溶解し、-5℃に冷却し結晶化させた。これをろ過して、BOO 高含有油脂を得た(BOO-rich experimental oil)。BOO 高含有油脂の脂肪酸組成は Table 4-1-1 に、TAG 組成は Table 4-1-2 に示した。なお、脂肪酸組成は第3章第1節 2-4、また TAG

組成は第 2 章 2-1-4 と同様の方法で測定した。

2-2. 食餌組成

食餌組成は AIN-93G 組成に基づき(61)、油脂含量を 28%に改変した(Table 4-1-3)。コントロールには大豆油を用いた(SO 群、オリエンタル酵母工業)。BOO 高含有油脂群は、大豆油の 20%を BOO 高含有油脂に置換した(BOO 群)。油脂以外の実験材料として、タンパク質源はビタミンフリーカゼイン(オリエンタル酵母工業)を用いた。その他は、オリエンタル酵母工業製の α -コーンスターチ、 β -コーンスターチ、AIN-93 ビタミンミックスおよび AIN-93G ミネラルミックスを使用した。セルロールおよび重酒石酸コリン溶液は和光純薬製を使用した。シュクロースは市販品を用いた。予備飼育時には、CRF-1(オリエンタル酵母工業)を用いた。

2-3. 実験動物および飼育

6 週齢 Specific-pathogen-free Wistar 系雄性ラット(日本 SLC)を用いた。飼育は日本栄養・食糧学会ガイドライン(日本政府政令 105 条第 6 項)に基づいて行った。各ラットは温度 $23 \pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、明暗サイクル 07:00-19:00 の管理環境下、ステンレスケージにて個別飼育を行った。各ラットを CRF-1 食にて 4 日間予備飼育した後、体重が群間で等しくなるよう 2 群に群分けを行った(1 群 $n=14$)。各試験食で 6 週間飼育し、試験期間中は自由摂食および自由飲水とした。

2-4. 解剖および臓器摘出、糞便採取

試験期間終了後、20:00 より 16 時間絶食を行った。絶食時間終了後、イソフルランによるガス麻酔を行った。無痛条件下で開腹し、ヘパリン処理したシリンジを用いて下大動脈より採血、屠殺した。肝臓、睾丸周囲脂肪、腎臓周囲脂肪、腸間膜脂肪を摘出し、重量を測定した。血

液は 4℃、3,000rpm で 15 分間遠心分離し、血漿を得た。血漿および各臓器は分析まで-80℃で保存した。

試験終了 3 日前から、ステンレスケージの下にトレイを引き、糞便を毎日回収した。回収した糞便は直ちに重量を測定し、凍結した。3 日間の糞便を合わせて凍結乾燥し、乾燥後の重量を測定した。

2-5. 血液の脂質分析

血漿 TAG 濃度、総コレステロール濃度、グルタミン酸オキサロ酢酸トランスアミナーゼ(GOT)、グルタミン酸ピルビン酸トランスアミナーゼ(GPT)、血糖は Fuji DryChem7000V(富士フィルム)を用いて測定した。

2-6. 肝臓中の脂質分析

2-6-1. 肝臓脂質の抽出

Folch 法に従って、肝臓中の脂質を抽出した(53)。肝臓 0.5g に 15mL のメタノールを加えてホモジナイズし、抽出液をメスフラスコに移した。残渣に 30mL のクロロホルムを加えてリンスした後、リンス液も抽出液に加えた。これを 40℃で 30 分間インキュベートした。水冷し、クロロホルム:メタノール=2:1 溶液で 50mL にフィルアップした。その後、共栓付メスシリンダーにろ過し、ろ液量を測定後、そこにろ液量の 20%分の水を添加し、転倒混和した。これを 4℃で一晩静置した後、上層をアスピレータで除去した。下層をメスフラスコに移し濃縮し、濃縮した脂質画分を石油エーテルにてメスフラスコに移してフィルアップし、-20℃にて各種分析まで保存した。

2-6-2. 肝臓 TAG 分析

TAG 分析は Fletcher らの方法を用いて分析した(62)。上記 2-6-1 で得られた肝臓脂質溶液 0.5mL にケイ酸を加えて 5 分間攪拌して、リン脂質を吸着除去させた。その後、3,000rpm で 10

分間遠心分離して上層 1.0mL を採取した。上層を乾固させ、2.0mL のイソプロパノール:水=9:1 溶液と 0.6mL の 5%水酸化カリウム溶液(*1)を加えて 65℃で 30 分間けん化した。1.0mL の 0.03M メタ過ヨウ素酸ナトリウム(*2)と 0.5mL のアセチルアセトン溶液(*3)を加え、50℃で 30 分間加熱した。冷却して、405nm で吸光度を測定した。グリセロール量から OOO 換算で TAG 量を算出した。

(*1)5g の水酸化カリウムを、60mL の水に溶解後、イソプロパノールで 100mL にメスアップした。

(*2) 12mL の 0.025M メタ過ヨウ素酸ナトリウムに、20mL のイソプロピルアルコールを加え、1M 酢酸溶液で 100mL にメスアップした。

(*3) 0.75mL のアセチルアセトンに 2.5mL のイソプロピルアルコール、15.4g の酢酸アンモニウムを加えて、水で 100mL にメスアップした。

2-6-3 肝臓総コレステロール分析

コレステロール分析は Sperryらの方法を用いて分析した(63)。上記 2-6-1 で得られた肝臓脂質溶液 0.5mL をサンプリングし、石油エーテルを乾固させた。そこに 0.5mL のエタノール:アセトン=1:1 溶液と 50%水酸化カリウム溶液 1 滴を加えて専用のガラス棒でよく攪拌した後、40℃で 30 分間けん化した(10 分おきに攪拌)。冷却後、0.1%フェノールフタレイン溶液を 1 滴、10%酢酸溶液を 7 滴添加後、さらに 10%酢酸溶液を 1 滴滴下した。そこに 0.2mL の 0.5%ジギトニン溶液(*1)を加え、ガラス棒で 5 分おきに 30 分間攪拌した。この状態で 1 晩静置した。翌日、3,000rpm で 15 分間遠心分離し、上層を除去した。沈殿に 1.0mL のジエチルエーテルを加えて攪拌し、3,000rpm で 5 分間遠心分離した。白色の沈殿があることを確認してから、上層を除去し、110℃の乾燥機に 30 分間入れてジエチルエーテルを完全に乾固させた。乾固後の熱い間に 0.5mL の氷酢酸を加えて、ガラス棒で白色の沈殿がなくなるまで攪拌し、溶解させた。常温に戻し、1.0mL の発色試薬(*2)を加えて 25℃で 30 分間反応させ、620nm の吸光度を測定

した。

(*1) 50mg のジギトニンを 50%エタノール溶液で 50mL にメスアップした。

(*2) 40mL の無水酢酸を冷却しながら 2.0mL の濃硫酸を加えた。

2-7. 糞便脂肪分析

凍結乾燥した糞便は破砕機で粉末にした。糞便中の脂肪量はソクステック(FOSS Japan)を用いて測定した。専用の円筒ろ紙に 1.0g の糞便と 300 μ L の酢酸を計りとり、石油エーテルを用いて 120°Cで 60 分間抽出し、その後冷却管をリンスした。抽出後、石油エーテルを完全に乾固させ、重量を測定した。両群の食餌も同様の方法で脂肪を抽出した。抽出された食餌由来の脂肪量と各個体の試験期間終了前 3 日間の摂食量より、各個体の摂取脂肪量を算出した。摂取脂肪量と抽出した糞便中の脂肪量より、吸収された脂肪量とみかけの脂肪吸収率を算出した。

2-8. 統計解析

データは平均値 \pm SE で示した。各項目の統計解析は Student's *t*-test ($P<0.05$)で行った。

3. 結果

3-1. 体重変化および摂食量

摂食量は 2 群間で有意な差は認められなかった(Table 4-1-4)。終体重は BOO 群の方が若干低値であったが、有意な差は認められなかった。

3-2. 肝臓および内臓脂肪重量

肝臓重量は SO 群と比較して、BOO 群で有意に低かった(Table 4-1-5)。睾丸周囲脂肪重量、腸間膜脂肪重量は SO 群と比べて、BOO 群で有意に低かった。腎臓周囲脂肪重量は有意な差は認められなかったが、BOO 群で低値であった。これらを合計した内臓脂肪重量は BOO 群で有意に低かった。

3-3. 血漿脂質

血漿 TAG 濃度は、SO 群と比較して BOO 群で有意に低かった(Table 4-1-6)。また、血漿総コレステロール濃度も同様に BOO 群で有意に低かった。GOT、GPT、血糖はいずれも 2 群間で有意差は認められなかった。

3-4. 肝臓脂質濃度

SO 群と比較して、BOO 群の肝臓 TAG 濃度および総コレステロール濃度は有意に低かった (Table 4-1-7)。

3-5. 糞便量、糞便脂肪量、見かけの脂肪吸収率

糞便量は、SO 群と比較して BOO 群で有意に高かった(Table 4-1-8)。糞便中の脂肪量は、SO 群と比較して BOO 群で有意に高かった。みかけの脂肪吸収率は、SO 群と比較して BOO 群で有意に低かった。

4. 考察

本節では、脂質代謝や肥満に対する BOO 摂取の効果について検討した。その結果、BOO 摂取による糞便への脂肪排泄の有意な増加が確認された(Table 4-1-8)。第 2 章第 1 節および

第2節の結果から、この現象は BOO の吸収抑制と共存する食事油脂の吸収遅延あるいは抑制がもたらしたことが示唆される。

BOO 摂取により、血漿および肝臓 TAG 濃度が有意に低下した(Table 4-1-6)。一般的に、血漿 TAG 濃度の低下効果は小腸からのカイロミクロン-TAG の低下に伴うものと、肝臓からの VLDL 分泌の低下に伴うものの2つが考えられる(64-66)。Arishima らは BOO のヒトでの食後血清 TAG 濃度の上昇抑制に対する効果について、BOO を含むコーンクリームスープを用いて検討している(60)。この検討では、BOO 摂取によって、血清 TAG 濃度の上昇が有意に抑制され、カイロミクロン-TAG の曲線下面積も有意に低下した。BOO 摂取では、リンパへの食事油脂の吸収遅延・抑制によりカイロミクロンに取り込まれる TAG が低下し、結果として肝臓に入る TAG 量が減少することで、肝臓 TAG 濃度が低下したと考えられる。ただし、肝臓 TAG 濃度の低下は、肝臓での脂肪酸合成に関わる酵素の活性あるいは遺伝子発現の抑制や β 酸化に関わる酵素の活性あるいは遺伝子発現の亢進によっても生じることが報告されており(67-72)、これにより血漿 TAG 濃度も低下することが示唆されることから、肝臓での脂質代謝への BOO 摂取による影響を確認することも必要と考えられる。

BOO 摂取は血漿や肝臓 TAG 濃度の低下のみならず、内臓脂肪の蓄積を抑制していた (Table 4-1-4)。BOO 摂取はカイロミクロンに取り込まれる TAG 量が減少することで、リポタンパク質リパーゼにより加水分解される量が減り、内臓脂肪に取り込まれる脂肪酸量が減少したためと考えられる。また、BOO の摂取は小腸からの TAG の吸収量を減少させるため、カロリー摂取量は少なくなると推察される。これも内臓脂肪の蓄積を抑制する一因であると考えられる。これにより BOO は血中 TAG 濃度の低下効果に加え、抗肥満効果があると推察される。

Table 4-1-1 Fatty acid composition of BOO-rich experimental oil

| Fatty acids | [%] |
|-------------|------|
| 16:0 | 2.6 |
| 18:0 | 3.9 |
| 18:1 n-9 | 56.3 |
| 18:2 n-6 | 2.9 |
| 20:0 | 3.0 |
| 22:0 | 30.9 |

Table 4-1-2 TAG contents of BOO-rich experimental oil

| Ingredient | [%] | TAGs | [%] |
|------------|------|------|------|
| St-O-O | 56.7 | | |
| | | BOO | 41.8 |
| | | SOO | 4.3 |
| | | POO | 1.7 |
| | | AOO | 3.6 |
| | | BLiO | 5.3 |
| St-O-St | 25.3 | | |
| | | BOB | 6.5 |
| | | BOS | 4.8 |
| | | POS | 4.3 |
| | | BOP | 3.8 |
| OOO | 9.4 | | |
| DAG | 5.9 | | |
| unknown | 2.7 | | |

St: saturated fatty acid

Table 4-1-3 Diet compositions

| g/100g | SO | BOO |
|---------------------------|-------|-------|
| Soybean oil ¹ | 28.00 | 22.40 |
| BOO-rich experimental oil | - | 5.60 |
| Casein | 20.00 | 20.00 |
| L-Cystine | 0.30 | 0.30 |
| β -Cornstarch | 18.75 | 18.75 |
| α -Cornstarch | 13.20 | 13.20 |
| Sucrose | 10.00 | 10.00 |
| Cellulose | 5.00 | 5.00 |
| Mineral mix ² | 3.50 | 3.50 |
| Vitamin mix ³ | 1.00 | 1.00 |
| Choline bitartrate | 0.25 | 0.25 |

¹ Oriental Yeast, soybean oil contains *tert*-buthylhydroquinone.

² AIN-93G mixture, Oriental Yeast

³ AIN-93 mixture, Oriental Yeast

Table 4-1-4 Body weight and food intake

| | SO | BOO |
|-------------------------|----------------|----------------|
| Initial body weight [g] | 160 \pm 1 | 160 \pm 1 |
| Final body weight [g] | 316 \pm 4 | 309 \pm 4 |
| Food intake [g/day] | 12.9 \pm 0.2 | 13.0 \pm 0.2 |

Values are means \pm SE, n=14.

Table 4-1-5 Liver weight and adipose tissue weight

| | SO | BOO |
|--|-----------------|-------------------|
| Liver [g/100g body weight] | 2.60 \pm 0.02 | 2.52 \pm 0.03 * |
| Adipose tissue weight [g/100g body weight] | | |
| Epididymal | 2.84 \pm 0.10 | 2.49 \pm 0.09 * |
| Perirenal | 2.75 \pm 0.11 | 2.52 \pm 0.12 |
| Mesenteric | 1.84 \pm 0.06 | 1.62 \pm 0.08 * |
| Total | 7.43 \pm 0.27 | 6.62 \pm 0.27 * |

Values are means \pm SE, n=14. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 4-1-6 Plasma parameters

| | SO | BOO |
|---------------------------|------------|--------------|
| TAG [mg/dL] | 82.5 ± 7.1 | 65.1 ± 3.8 * |
| Total cholesterol [mg/dL] | 49.3 ± 2.4 | 42.6 ± 1.9 * |
| GOT [U/dL] | 63.4 ± 2.4 | 66.4 ± 1.8 |
| GPT [U/dL] | 34.2 ± 1.7 | 37.1 ± 3.2 |
| Glucose [mg/dL] | 162 ± 2 | 166 ± 8 |

Values are means±SE, n=14. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 4-1-7 Concentrations of lipid parameters in liver

| | SO | BOO |
|--------------------------------|-------------|---------------|
| TAG [mg/g Liver] | 28.7 ± 3.1 | 20.9 ± 1.8 * |
| Total cholesterol [mg/g Liver] | 5.26 ± 0.19 | 4.44 ± 0.15 * |

Values are means±SE, n=14. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 4-1-8 Fat intake, fecal weight, fecal fat weight, and apparent absorption of fat

| | SO | BOO |
|--------------------------------|-----------------|-------------------|
| Fat intake [g/day] | 3.54 \pm 0.07 | 3.52 \pm 0.07 |
| Fecal weight [g/day] | 0.99 \pm 0.02 | 1.23 \pm 0.03 * |
| Fecal fat [mg/day] | 88.2 \pm 4.7 | 278 \pm 12 * |
| Apparent absorption of fat [%] | 97.5 \pm 0.1 | 92.1 \pm 0.2 * |

Values are means \pm SE, n=14. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

第4章 第2節 BOO 摂取によるラット肝臓での脂質代謝関連酵素に 与える影響

1. 目的

前節より、BOO 摂取によって、糞便への食事油脂の排泄増加が確認された。これは食事油脂の吸収抑制によるもので、この作用により血漿および肝臓 TAG 濃度の低下や内臓脂肪重量の減少が引き起こされたと考えられた。しかし、肝臓での脂質代謝は TAG の吸収量だけでなく、脂質代謝に関わる酵素が関与することもあり得るが、BOO 摂取が肝臓での脂質代謝に与える影響までは確認できていない。そこで、高脂肪食下での BOO 摂取時における肝臓での脂肪酸合成系酵素および β 酸化系酵素の活性を測定した。

2. 実験材料および方法

2-1. BOO 高含有油脂の作製および食餌組成

BOO 高含有油脂は、第4章第1節 2-1 と同様の方法で調製した。本検討で使用した BOO 高含有油脂中の BOO 含量は 45.5%であった。

食餌組成は AIN-93G 組成に基づき、第4章第1節 2-2 Table 4-1-3 とすべて同じ食餌組成とした(油脂含量 28%)。BOO 群は大豆油(SO)の 20%を BOO 高含有油脂に置換した。

2-2. 実験動物および飼育、解剖および臓器摘出

実験動物および飼育は第4章第1節 2-3 に示した方法で実施した。1 群 n=8、摂取期間は

6週間とした。試験期間終了後、絶食を行わずにイソフルランによるガス麻酔を行った。無痛条件下で開腹し、ヘパリン処理したシリンジを用いて下大動脈より採血、屠殺した。肝臓を摘出し、重量を測定した。血漿の処理は第4章第1節2-4の方法で行った。血漿は分析まで-80℃で保存した。

2-3. 血漿および肝臓の脂質分析

血漿 TAG 濃度および肝臓 TAG 濃度の分析は、それぞれ第4章第1節2-5、2-6と同様の方法で測定した。

2-4. 肝臓の脂質代謝関連酵素の活性測定

2-4-1. 肝臓総ホモジネート画分およびサイトソル画分の採取

凍結していない肝臓 1.5g を氷冷下で 12mL のホモジナイズ用 buffer(*)でホモジナイズした後(6mL を 2 回)、チューブを転倒混和して 5℃、700×g で 10 分間遠心分離して、核を沈殿させた。浮遊している脂肪を除去し、上層を総ホモジネート画分として採取し、一部を-80℃で冷凍保存した。残りの上層を 4℃、125,000×g で 60 分間遠心分離して(Beckman、スイングローター使用)、ミクロソームを沈殿させた。上層をサイトソル画分とし、-80℃で冷凍保存した。

(*)ホモジナイズ用 buffer は 10mM Tris と 1mM EDTA-2Na、0.25M シュクロースを水 100mL に溶解した。

2-4-2. 各画分のタンパク質量の測定

総ホモジネート画分またはサイトソル画分それぞれ 100μL を遠沈管に取り、1.5mL の 10%TCA 溶液を加えて攪拌し、10℃、3,000rpm で 5 分間遠心分離した。沈殿があることを確認してから上層を除去し、沈殿に 1mL のエタノール:ジエチルエーテル:塩酸=74:24:1 溶液を加えて攪拌し、10℃、3,000rpm で 5 分間遠心分離した。上層を除去し、ろ紙の上に逆さにして

溶媒を完全に乾固させた。そこに 1mL の 0.8M 水酸化ナトリウム溶液を加えて、沈殿を完全に溶解させ、1mL の水を加えて攪拌し、タンパク質溶液を得た。

各画分のタンパク質量は Lowry らの方法を用いて測定した(73)。上記タンパク質溶液 0.5mL に 2.5mL の試薬 A(*)を加えて攪拌した。10 分間静置し、250 μ L のフェノール試薬を加えて攪拌した。60 分暗所にて静置し、分光光度計で 660nm での吸光度を測定した。スタンダードには牛血清アルブミン(和光純薬)を用い、各画分のタンパク質量の測定と同様の操作を行って検量線を作成した。この検量線から、各画分のタンパク質量を算出した。

(*)試薬 A は下記試薬 B:C1:C2=100:1:1 で混合したものとした。

試薬 B は 0.1M 水酸化ナトリウムと 2%炭酸ナトリウムを混合した。試薬 C1 は 0.5%硫酸銅 5 水和物、試薬 C2 は 1%酒石酸ナトリウムカリウム溶液とした。

2-4-3. 脂肪酸合成酵素(FAS)活性の測定

FAS の活性は Kelley らの方法で測定した(74)。0.3mM NADPH および 0.2mM EDTA-2Na を含む 100mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.0)と最終濃度 0.05mM アセチル CoA にサイトソル画分を添加し、NADPH の減少を 30 $^{\circ}$ C、340nm で 1.5 分間追跡した。その後マロニル CoA(最終濃度 0.2mM)を加えて混合し、さらに 5 分間吸光度を追跡した(総容量 1mL)。得られた吸光度の傾きからブランク(酵素源なし)の吸光度の傾きを差し引き、NADPH の減少速度を算出した。なお、NADPH のモル吸光係数は 6220 である。

2-4-4. カルニチンパルミトイルトランスフェラーゼ(CPT)活性の測定

CPT の活性は Markwell らの方法で測定した(75)。0.25mM 2-ニトロ安息香酸、1.25mM EDTA および 0.1%Triton-X100 を含む 58mM Tris 塩酸緩衝液(pH8.0)と最終濃度 0.04mM パルミトイル CoA に総ホモジネート画分を添加した。30 $^{\circ}$ C、412nm で 5 分間追跡し(これをブランクとする)、その後 L-カルニチン(最終濃度 1.25mM)を添加し、5 分間吸光度を追跡した(総容量 1mL)。得られた吸光度の傾きからブランクの傾きを差し引き、CoA の生成速度を算出した。

なお、CoA と 2-ニトロ安息香酸から生じる黄色色素 5-チオ-2-ニトロ安息香酸のモル吸光係数は 13600 である。

2-4-5. アシル-CoA オキシダーゼ(ACO)活性の測定

ACOの活性はHashimotoらの方法で測定した(76)。10.6mM フェノール、0.82mM 4-アミノアンチピリン、10 μ M FAD、4U のペルオキシダーゼ(ホースラディッシュ由来)および 0.2mg のウシアルブミン(フラクション V、脂肪酸フリー)を含む 50mM リン酸カリウム緩衝液(pH7.4) と最終濃度 0.1mM パルミトイル CoA に総ホモジネート画分を添加した(総容量 1mL)。30℃、500nm で 11 分間吸光度を追跡し、得られた吸光度の傾きから過酸化水素の生成速度を算出した。なお、過酸化水素とフェノール、4-アミノアンチピリン、ペルオキシダーゼによって生じる紅色色素のモル吸光係数は 6390 である。

2-4-6. リンゴ酸酵素(ME)活性の測定

MEの活性はOchoaらの方法で測定した(77)。最終濃度 1.2mM L-リンゴ酸、4mM 塩化マンガ、1.2mM NADP⁺を含む 64mM トリエタノールアミン緩衝液(pH7.4)にサイトソル画分を添加した(総容量 1mL)。27℃、340nm で 2 分間吸光度を追跡し、得られた吸光度の傾きから NADPH の生成速度を算出した。

2-4-7. グルコース-6-リン酸脱水素酵素(G6PDH)活性の測定

G6PDHの活性はKelleyらの方法で測定した(78)。最終濃度 3.3mM グルコース-6-リン酸、1.2mM NADP⁺、0.5U の 6-ホスホグルコネイトデヒドロゲナーゼ、30mM 塩化マグネシウムを含む 100mM Tris 塩酸緩衝液(pH7.0)にサイトソル画分を添加した。30℃、340nm で 4 分間吸光度を追跡し(総容量 1mL)、得られた吸光度の傾きから NADPH の生成速度を算出した。

2-5. 統計解析

データは平均値 \pm SE で示した。各項目の統計解析は Student's *t*-test ($P<0.05$)で行った。

3. 結果

3-1. 体重変化および摂食量

摂食量は2群間で有意な差は認められなかった(Table 4-2-1)。終体重は、2群間で有意な差は認められなかったが、BOO 群でわずかに低値であった。

3-2. 肝臓重量、肝臓および血漿脂質濃度

肝臓重量は SO 群と比較して、BOO 群で低い傾向であった(Table 4-2-1、 $P<0.1$)。SO 群と比較して、BOO 群の肝臓 TAG 濃度は有意な差は認められなかったが、低い傾向が示された(Table 4-2-2、 $P<0.1$)。血漿 TAG 濃度は、SO 群と比較して BOO 群で有意に低かった。

3-3. 肝臓における脂質代謝関連酵素の活性

β 酸化系酵素である ACO 活性のみ BOO 群で有意に高かった(Table 4-2-3)。また、同じ β 酸化系酵素である CPT 活性は BOO 群で高い傾向であった($P<0.1$)。SO 群と比較して、FAS 活性は BOO 群で低い傾向であった($P<0.1$)。

4. 考察

BOO 摂取による肝臓 TAG 濃度の低下のメカニズム探索に際し、肝臓での脂質代謝関連酵素への影響について検討した。前節において、肝臓 TAG 濃度の低下は食事油脂の吸収遅延・抑制によるものと考察され、本節においても作用は弱いながらも同様の傾向が確認された(Table 4-2-2)。本節は摂取直後の肝臓での脂質代謝に関わる酵素への影響を見るために絶食しておらず、そのため BOO 群の肝臓 TAG 濃度は低下傾向に留まったと考えられる。

茶カテキンや n-3 多価不飽和脂肪酸(n-3 PUFA)の摂取は、FAS や ME、G6PDH など脂肪酸合成に関わる複数の酵素の活性あるいは遺伝子発現を抑制させ、CPT やアシル-CoA 合成酵素のような β 酸化関連の複数の酵素の活性あるいは遺伝子発現を亢進させることが報告されている(67-72)。そして、これら肝臓での脂質代謝に関わる酵素の変動が、肝臓での TAG の蓄積の抑制を引き起こすと考えられており、食事油脂の吸収遅延・抑制作用に加えて肝臓での更なる代謝亢進に BOO 摂取が影響すると推察された。しかし、BOO 摂取では肝臓 FAS 活性の低下傾向と ACO 活性の有意な上昇、CPT 活性の上昇傾向というわずかな変化しか確認されなかった(Table 4-2-3)。カテキンや n-3PUFA の結果と比較すると、BOO 摂取による肝臓での脂質代謝関連酵素の変動は、肝臓 TAG 濃度の低下の主要因ではないと考えられる。今回の検討で唯一有意な活性増加が認められた ACO はペルオキシソーム内での β 酸化の初発酵素であるが、これはミトコンドリア内での β 酸化とは異なり、炭素数 18 以上の長鎖脂肪酸がターゲットとなる(79-84)。AOC は、生体内での存在量が極めて少ない炭素数 22 以上の長鎖飽和脂肪酸を速やかに酸化させると考えられている(72)。ラットに重水素ベヘン酸エチルを摂取させた検討から、肝臓や内臓脂肪にはベヘン酸ではなくパルミチン酸やステアリン酸が検出されており、 β 酸化によりベヘン酸が異化されることを示唆している(85)。本検討より、BOO 摂取による ACO 活性の亢進は、肝臓 TAG 濃度の低下のためではなく、ベヘン酸をパルミチン酸やステアリン酸などに変換するために誘導されたことが示唆される。

BOO は血漿 TAG 濃度の有意な低下を引き起こす(Table 4-2-2)。BOO を摂取することで、食事油脂の吸収が抑えられた結果、腸管から血中に流入する TAG 量が減少し、これに伴って肝臓 TAG 濃度が低下した、すなわち食事油脂の吸収抑制が肝臓 TAG 濃度低下の主要因であることが強く示唆された。

Table 4-2-1 Body weight, food intake, and liver weight

| | SO | BOO |
|----------------------------|-------------|-------------|
| Initial body weight [g] | 175 ± 1 | 175 ± 1 |
| Final body weight [g] | 310 ± 7 | 305 ± 4 |
| Food intake [g/day] | 12.1 ± 0.2 | 12.1 ± 0.1 |
| Liver [g/100g body weight] | 3.26 ± 0.05 | 3.12 ± 0.05 |

Values are means±SE, n=8.

Table 4-2-2 Concentrations of liver and plasma TAG

| | SO | BOO |
|--------------------|------------|------------|
| Liver [mg/g Liver] | 45.2 ± 3.2 | 36.2 ± 2.9 |
| Plasma [mg/dL] | 177 ± 17 | 127 ± 10 * |

Values are means±SE, n=8. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 4-2-3 Enzyme activities of fatty acid synthesis and β -oxidation in liver

| | SO | BOO |
|-----------------------------|-----------------|-------------------|
| FAS [nmol/min/mg protein] | 3.36 \pm 0.45 | 2.14 \pm 0.47 |
| CPT [nmol/min/mg protein] | 1.43 \pm 0.17 | 1.96 \pm 0.21 |
| ACO [nmol/min/mg protein] | 2.93 \pm 0.20 | 3.50 \pm 0.17 * |
| ME [nmol/min/mg protein] | 27.3 \pm 2.5 | 30.0 \pm 1.9 |
| G6PDH [nmol/min/mg protein] | 13.4 \pm 0.9 | 14.6 \pm 0.5 |

Values are means \pm SE, n=8. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, $P<0.05$).

第4章 第3節 BOO 摂取によるヒトでの脂肪排泄に与える影響

1. 目的

第4章第1節のラットでの BOO 摂取試験によって、糞便への食事油脂の排泄促進効果や血漿および肝臓 TAG 濃度の低下効果および内臓脂肪重量の減少効果が得られることを明らかにした。その原因は BOO の低吸収性だけではなく、共存する食事油脂の吸収抑制と考えられた。一方ヒトでは、BOO 摂取による食後の血清 TAG 濃度の上昇抑制効果が確認されているが(60)、糞便への食事油脂の排泄は検討されていない。そこで、軽度脂質異常症者に継続的に BOO を摂取させた時の糞便への TAG 排泄について検討した。

また、低吸収性油脂を摂取すると、食事油脂の吸収阻害と共にミネラルや脂溶性ビタミンの吸収阻害が起こることがある(36)。低吸収性油脂と同様に、BOO 摂取の場合もこのような吸収阻害が懸念される。そこで、糞便中のミネラルや脂溶性ビタミンの排泄についても検討した。

2. 実験材料および方法

本試験は株式会社 TES ホールディングスの倫理委員会において、試験実施計画書並びに被験者への同意説明文書の内容について審議され、実施の承認を得た。その後、ヘルシンキ宣言に基づく倫理的原則を遵守し、被験者の人権ならびに安全性を第一に考慮して、以下の試験を実施した。

2-1. 被験者の選抜

スクリーニング時の空腹時血清 TAG 濃度が 150 から 250mg/dL の軽度脂質異常症者のうち、①同意取得時の年齢が 30 歳以上 60 歳以下の健常男性、②1日1回以上の便通がある、

③現在通院および投薬を受けていない、④強度の肉体労働に従事していない、以上の条件を満たす 14 名を本試験の被験者とした。試験開始前に被験者にインフォームドコンセントを実施し、各被験者の自由意思により試験参加の同意を得た。

2-2. 試験食の作製

プラセボ食には BOO を含まない植物油脂(SO、菜種油、パーム油、パーム核油)で作ったマーガリンを使って焼成したソフトクッキーを用いた。試験食には、植物油脂の 40%を BOO 高含有油脂に置換して作ったマーガリンを使って焼成したソフトクッキーを用いた。なお、本試験に用いた BOO 高含有油脂の BOO 含量は 55%である。マーガリンの脂肪酸組成を Table 4-3-1 に示した。

ソフトクッキーの組成は(g/100g)、マーガリン:24.3、上白糖:19.4、バニラフレーバー:0.05、全卵:7.8、薄力粉:48.5 とした。なおソフトクッキーは 1 枚 11.4g とした。

2-3. 試験方法

本試験はプラセボ対照二重盲検クロスオーバー法にて、Figure 4-3-1 の日程で実施した。ウォッシュアウトは 8 日間とし、腸内状況のばらつきをより小さくするために、試験開始前に調整期間を 4 日間設けた。被験者間の食事のばらつきを減らすため、調整期間および試験期間中の食事は規定食のみとした。今回の検討では、1 日の摂取油脂量がソフトクッキーも含めて 60g/day となるように規定食を支給した。ソフトクッキーは朝食時 2 枚、夕食時 3 枚を規定食と共に摂取させた。本試験期間中は不規則な生活や過度の飲酒や運動を避け、運動に関しては、本試験開始前の日常生活と同様の量・質を維持するよう指導した。さらに被験者には毎日、試験食の摂取状況、支給食の摂取量、摂取内容、間食の摂取量と内容、アルコールの摂取量と内容並びにその他健康状態を記録させた。

2-4. 血液分析

試験期間開始時(Day 0)および終了時(Day 7)に採血を行った。血液を 5℃、3,000rpm で 10 分間遠心分離し、血漿を得た。血漿 TAG 濃度、総コレステロール濃度、HDL-コレステロール濃度、GOT、GPT は JCA-BM8060(JEOL)にて測定した。血糖は JCA-BM9130(JEOL)にて測定した。

2-5. 糞便の分析

糞便の採取は各試験期間 5・6・7 日目の全排泄便を対象とし、毎日採取した糞便を分析機関に送付した。3 日間の糞便を合わせて真空凍結乾燥機で乾燥し、乾燥後の糞便の重量を測定した。糞便水分量は乾燥前後の重量と Kett 水分計(Kett Electric Laboratory)より算出した。糞便に濃塩酸を加え、クロロホルム:メタノール=2:1 溶液で脂肪を抽出し、溶媒留去後の重量を糞便中の脂肪量とした。糞便脂肪を 0.5mol/L 水酸化ナトリウム-メタノール溶液でけん化し、ヘキサンで抽出したものを糞便中の脂肪酸とした。糞便脂肪酸を 3 フッ化ホウ素メタノール錯体でトランスメチル化した後、ヘキサンで抽出し、無水硫酸ナトリウムで脱水したものをガスクロマトグラフィーに供して、糞便脂肪の脂肪酸組成を測定した。糞便脂肪酸量と脂肪酸組成から、糞便ベヘン酸量およびベヘン酸以外の脂肪酸量を算出した。

糞便を湿式で灰化した後、糞便中のカルシウム(Ca)、マグネシウム(Mg)、ナトリウム(Na)、リン(P)を食品成分表の方法に従って、原子吸光法で測定した(86)(Z-8100、日立製作所)。脂溶性ビタミン(ビタミン A、D、E、K)は、食品成分表に従って測定した(86)(Prominence システム、島津製作所)。

2-6. 統計解析

データは平均値±SE で示した。糞便脂肪パラメータおよび糞便ミネラル、脂溶性ビタミンの

統計解析は、群間比較に対応のある *t*-test で行った($P<0.05$)。摂取前後の血漿 TAG 濃度、総コレステロール濃度、HDL-コレステロール濃度、血糖、GOT、GPT の統計解析は、各群の摂取前後および Day0 あるいは Day7 でのプラセボ群と BOO 群の群間比較に対応のある *t*-test で行った($P<0.05$)。

3. 結果

3-1. 被験者の背景および有害事象

本試験に参加した被験者の平均年齢は 44.9 ± 1.7 歳、体重は 75.9 ± 1.8 kg であった。試験期間中、試験食あるいはプラセボ食摂取によって生じたすべての体調に関する自覚症状のうち、イライラ感、意欲減退、食欲不振、倦怠感、不眠、頭痛、耳鳴り、めまい、かゆみ、嘔吐、下痢、軟便、便秘、腹部膨満感、腹痛といった有害事象は認められなかった。

3-2. 摂取前後の血漿生化学パラメータの変化

Day 0 時の血漿生化学パラメータは、いずれも 2 群間で有意な差は認められなかった(Table 4-3-2)。血漿 TAG 濃度は、プラセボ群および BOO 群で共に Day 0 よりも Day 7 の方が高値であったが、それぞれ有意な差は認められなかった。Day 7 での血漿 TAG 濃度はプラセボ群よりも BOO 群の方が低かったが、有意な差は認められなかった。血漿総コレステロール濃度はプラセボ群、BOO 群共に Day 7 で低かったが、有意な差は認められなかった。血漿 HDL-コレステロール濃度も総コレステロール濃度と同じ傾向で、2 群間で有意差は見られなかった。血糖、GOT、GPT においても、摂取後の 2 群間での有意な差は認められなかった。

3-3. 糞便量、糞便中の脂肪量、脂肪酸量および脂肪酸組成

プラセボ群と比較して、BOO 群で糞便湿重量が有意に多かった(Table 4-3-3)。糞便乾燥重量は有意な差は認められなかった。糞便中の水分量、脂肪量、脂肪酸量は、それぞれプラセボ群と比較して BOO 群で有意に高かった。糞便脂肪の脂肪酸組成は、プラセボ群と BOO 群との間に有意な差は認められなかった(Figure 4-3-2)。プラセボ群と比較して、糞便ベヘン酸量は BOO 群で有意な差は認められなかったが、高値の傾向にあった(Table 4-3-3)。糞便中のベヘン酸以外の脂肪酸量は、BOO 群で有意に高かった。

3-4. 糞便中のミネラルおよび脂溶性ビタミン量

いずれの糞便中のミネラルおよび脂溶性ビタミンも 2 群間で有意な差は認められなかった(Table 4-3-4)。

4. 考察

本検討より、BOO の摂取による脂肪および脂肪酸の糞便への排泄増加がヒト試験において明らかとなり(Table 4-3-3)、この結果はこれまでのラットで得られた結果を支持するものであった。さらに、BOO 摂取により、ベヘン酸だけではなくベヘン酸以外の脂肪酸も糞便排泄が増加することがヒトにおいても示された(Table 4-3-3)。糞便へのベヘン酸の排泄はわずかな増加に留まったが、不飽和脂肪酸との共存によりベヘン酸の吸収率が高まったためと考えられる(55-57)。そして、このことは、他のベヘン酸を含む構造脂質の投与時よりも、BOO 投与時におけるラットリンパでのベヘン酸の吸収率が高かったことから推察される。

本ヒト試験において、プラセボ群の血漿 TAG 濃度は Day 0 よりも Day 7 で上昇したのに対し、BOO 群の上昇はわずかであった(Table 4-3-2)。この上昇は、1 日の摂取油脂量が 60g と比較

的多かったためと思われる。しかし、BOO を摂取することで、食事油脂の吸収が遅延・抑制されたために、プラセボ摂取のような血漿 TAG 濃度の上昇を抑制する傾向が見られたと考えられる。BOO を用いた別のヒト検討において、食後の血清 TAG 濃度の上昇抑制とカイロミクロン-TAG の曲線下面積の低下が確認されていることから(60)、長期間の継続的な BOO 摂取で、血漿 TAG 濃度の低下効果が期待できる。

今回の検討では、ソフトクッキーに用いたマーガリンに使用する油脂の 20%を BOO 高含有油脂に置換した。すなわち、2.46g/day の BOO 摂取量で、糞便への脂肪排泄促進効果が得られた。これまでのベヘン酸を含む低吸収性の構造脂質は下痢などの副作用が起こることが報告されている(36)。また過度の食事油脂の吸収阻害はミネラルや脂肪性ビタミンの吸収をも阻害してしまうため、サプリメントなどで補充する必要がある(15,21)。今回の検討では、BOO は下痢などの副作用を認めず、また、ミネラルや脂溶性ビタミンの吸収にも影響を与えなかった (Table 4-3-4)。

5. 小括

本章では、脂質代謝や肥満に対する BOO の有効性を検証した。ラットの検討において、BOO は糞便への脂肪排泄を増加させると共に、肝臓および血漿 TAG 濃度、内臓脂肪を低下させることが確認された。また、ヒトの検討においても BOO 摂取による糞便への脂肪排泄増加が認められ、ベヘン酸とベヘン酸以外の脂肪酸の両方の排泄増加によることが示された。そして、BOO 摂取は肝臓での脂肪酸合成系酵素の活性の抑制にはほとんど影響を与えず、 β 酸化系酵素の活性に対して僅かに亢進させる傾向のみ認められたに過ぎず、肝臓 TAG 濃度の低下に対して脂質代謝関連酵素の変動の関与はほとんどないと考えられた。これら結果から、

脂質代謝の改善や抗肥満効果は、小腸での TAG 吸収が BOO 摂取によって遅延あるいは抑制されることで得られると推察された。

Table 4-3-1 Fatty acid compositions of the test margarines

| Fatty acids | Placebo | BOO |
|-------------|---------|------|
| | [%] | |
| 12:0 | 5.9 | 3.5 |
| 14:0 | 2.1 | 1.3 |
| 16:0 | 7.3 | 5.1 |
| 18:0 | 7.9 | 6.8 |
| 18:1 n-9 | 52.4 | 53.9 |
| 18:2 n-6 | 15.2 | 10.0 |
| 18:3 n-3 | 6.9 | 4.1 |
| 20:0 | 0.5 | 1.6 |
| 20:1 n-9 | 0.9 | 0.6 |
| 22:0 | 0.4 | 12.4 |
| 24:0 | - | 0.3 |
| unknown | 0.7 | 0.4 |

Table 4-3-2 Plasma parameters

| | Placebo | | BOO | |
|---------------------------|-------------|------------|------------|------------|
| | Day 0 | Day 7 | Day 0 | Day 7 |
| TAG [mg/dL] | 198 ± 53 | 223 ± 91 | 200 ± 63 | 204 ± 64 |
| Total cholesterol [mg/dL] | 217 ± 8 | 210 ± 8 | 218 ± 7 | 208 ± 7 |
| HDL-cholesterol [mg/dL] | 49.7 ± 2.8 | 46.9 ± 3.0 | 49.3 ± 3.1 | 45.7 ± 3.0 |
| Glucose [mg/dL] | 98.2 ± 2.4 | 95.7 ± 2.2 | 97.4 ± 2.1 | 96.6 ± 2.3 |
| GOT [IU/L] | 23.1 ± 3.5 | 21.9 ± 5.5 | 20.8 ± 2.6 | 20.7 ± 1.8 |
| GPT [IU/L] | 33.9 ± 11.7 | 28.7 ± 5.1 | 28.4 ± 6.9 | 28.4 ± 5.5 |

Values are means±SE, n=14.

Table 4-3-3 Fecal fat parameters

| | Placebo | BOO |
|--|-------------|----------------|
| Fecal wet weight [g/3 days] | 437 ± 39 | 570 ± 55 * |
| Fecal dry weight [g/3 days] | 100 ± 8 | 120 ± 12 |
| Fecal moisture [%] | 82.4 ± 0.6 | 84.3 ± 0.9 * |
| Fecal fat [g/3 days] | 5.44 ± 0.23 | 6.37 ± 0.27 ** |
| Fecal fatty acids [g/3 days] | 3.79 ± 0.16 | 4.40 ± 0.20 ** |
| behenic acid [g/3 days] | 0.13 ± 0.02 | 0.16 ± 0.02 |
| fatty acids other than behenic acid [g/3 days] | 3.67 ± 0.15 | 4.24 ± 0.19 * |

Values are means±SE, n=14. * indicates significant differences for the placebo group (paired *t*-test, *P*<0.05). ** indicates significant differences for the placebo group (paired *t*-test, *P*<0.01).

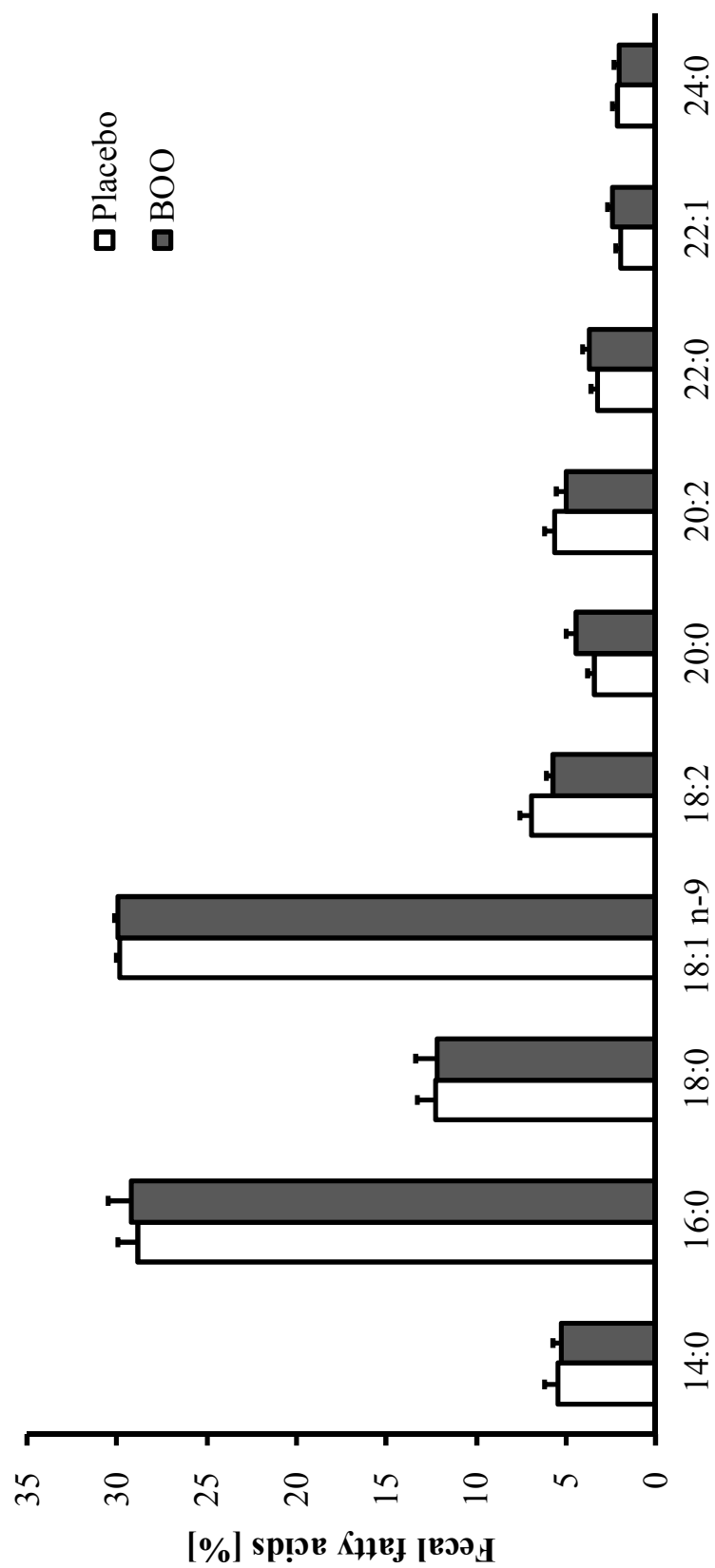


Figure 4-3-2 Fatty acid compositions of fecal fat
Values are means \pm SE, n=14.

Table 4-3-4 Fecal minerals and fat-soluble vitamins

| | Placebo | BOO |
|-----------------------|-------------|-------------|
| Calcium [mg/3 days] | 29.4 ± 1.8 | 32.3 ± 1.7 |
| Magnesium [mg/3 days] | 29.4 ± 1.9 | 32.1 ± 1.7 |
| Sodium [mg/3 days] | 170 ± 10 | 186 ± 10 |
| Potassium [mg/3 days] | 112 ± 8 | 131 ± 7 |
| Vitamin A [IU/3 days] | 513 ± 31 | 588 ± 33 |
| Vitamin D [IU/3 days] | 546 ± 29 | 562 ± 34 |
| Vitamin E [mg/3 days] | 2.64 ± 0.16 | 2.72 ± 0.22 |
| Vitamin K [µg/3 days] | 17.7 ± 1.0 | 18.1 ± 1.0 |

Values are means±SE, n=14.

第 5 章 難消化性構造脂質 BOO の安全性の検証

第 1 節 BOO 摂取による各組織でのベヘン酸の存在についての検証

1. 目的

これまでのラットやヒトでの検討から、BOO は肥満や脂質代謝の改善効果を有し、下痢や油
脂便などの副作用が見られない難消化性構造脂質であることを確認した。ベヘン酸はピーナ
ッツ油や菜種油などの一般的な植物性油脂に含まれており、食経験も豊富である。さらに、
BOO と同じベヘン酸を含む結晶促進剤として使用されている BOB は FDA から GRAS として
の認証を取得しており、安全性に関する報告もある(87,88)。同様に、GRAS としての認証を受
けているカプレニンも、複数の摂食試験から安全性を示している(39,40,42)。これらから、BOO
も安全な構造脂質と考えられる。本節では、体内でのベヘン酸の挙動について、BOO を含む
高脂肪食を 6 週間摂取した時のラットの各組織・血漿・脂肪組織中の脂肪酸組成を測定した。

2. 実験材料および方法

2-1. BOO 高含有油脂の作製および食餌組成

BOO 高含有油脂は、第 4 章第 1 節 2-1 で示した方法で調製した。ここで使用した BOO 高
含有油脂中の BOO 含量は 41.8%であった。

食餌組成は、AIN-93G 組成に基づき、第 4 章第 1 節 2-2 Table 4-1-3 とすべて同じ食餌組
成とした(食事油脂含量 28%)。また、BOO 群は SO の 20%を BOO 高含有油脂に置換した。

2-2. 実験動物および飼育、解剖および組織摘出

実験動物および飼育は、第4章第1節2-3に示した方法で実施した。1群 $n=7$ 、摂取期間は6週間とした。試験期間終了後、20:00より16時間絶食を行った。絶食時間終了後、イソフルランによるガス麻酔を行った。無痛条件下で開腹し、ヘパリン処理したシリンジを用いて下大動脈より採血、屠殺した。肝臓、心臓、腎臓、脾臓、肺、睾丸周囲脂肪、腎臓周囲脂肪を摘出し、重量を測定した。血漿の処理は第4章第1節2-4の方法で行った。血漿および各組織は分析まで -80°C で保存した。

2-3. 血液および各組織中の脂肪酸分析

血漿および各組織からの脂質の抽出は、第4章第1節2-6-1の方法を用いた。また、得られた脂質中の脂肪酸分析は、第3章第1節2-4の方法で行った。

2-4. 心臓リン脂質の分画と脂肪酸分析

上記2-3で得られた心臓脂質抽出液5mLを窒素ガスで濃縮した。この濃縮液を、シリカゲルプレート(Silica gel 60, Merck)にスポットした。クロロホルム:メタノール:酢酸:水=50:37.5:3.5:2溶液を展開溶媒として展開した。展開後、プレートの溶媒を乾固した。0.01%プリムリン溶液を噴霧し、UVランプを照射してリン脂質(ホスファチジルコリン(PC)、ホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルイノシトール(PI)、ホスファチジルセリン(PS)、カルジオリピン(CL))を単離した。得られた心臓リン脂質画分の脂肪酸分析は、第3章第1節2-4の方法で行った。

2-5. 統計解析

データは平均値 \pm SEで示した。各項目の統計解析はStudent's t -test ($P<0.05$)で行った。

3. 結果

3-1. 体重変化および摂食量

摂食量は2群間で有意な差は認められなかった(Table 5-1-2)。これまでの高脂肪食を用いた試験結果と同様、終体重はBOO群で低値であった。

3-2. 各組織重量

SO群と比較して、BOO群で心臓重量が有意に高かったが、その差はわずかであった(Table 5-1-3)。また、肝臓重量は低くなる傾向にあった。腎臓周囲脂肪重量はSO群比較してBOO群で有意に低かった。それ以外の組織では、2群間で有意な差は認められなかった。

3-3. 各組織および血漿の脂肪酸組成

肝臓では、SO群と比較してBOO群で有意にステアリン酸の高値、リノール酸の低値、アラキドン酸の高値およびベヘン酸の高値が認められた(Table 5-1-4)。肝臓脂質中のベヘン酸はSO群でも認められ、 $0.10 \pm 0.07\%$ に対し、BOO群では $0.46 \pm 0.05\%$ であった。肝臓でのSFAはBOO群で有意に高く、n-6PUFAは有意に低かった。心臓において、SO群と比較してBOO群で有意にパルミチン酸の低値、オレイン酸の高値、n-6ドコサテトラエン酸およびn-3ドコサペンタエン酸の低値が認められた(Table 5-1-5)。SO群の心臓脂質中にはベヘン酸が認められなかったが、BOO群では $0.76 \pm 0.05\%$ 検出された。また、BOO群において、MUFAの有意な高値とn-6PUFAの有意な低値が示された。腎臓において、SO群と比較してBOO群で有意にパルミチン酸の低値、オレイン酸の高値およびn-3ドコサペンタエン酸の低値が認められた(Table 5-1-6)。心臓脂質と同様に、SO群の腎臓脂質中ではベヘン酸は検出されなかったが、BOO群では $0.57 \pm 0.06\%$ 認められた。BOO群におけるMUFAの有意な高値とn-6PUFAの有意な低値が確認された。脾臓においては、SO群と比較してBOO群で有意なオレイン酸の高

値と n-3 ドコサペンタエン酸の低値が確認された(Table 5-1-7)。ベヘン酸は BOO 群のみで検出され、その量は $0.96 \pm 0.14\%$ であった。腎臓と同様に、BOO 群での MUFA の有意な高値と n-6PUFA の有意な低値が確認された。肺では、SO 群と比較して BOO 群で有意なパルミトオレイン酸、ステアリン酸、オレイン酸の高値、リノール酸の低値、ベヘン酸の高値、n-6 ドコサテトラエン酸の高値が認められた(Table 5-1-8)。SO 群の肺ではベヘン酸が検出され、その量は $0.66 \pm 0.06\%$ で、BOO 群は $1.30 \pm 0.07\%$ であった。腎臓や脾臓と同様に、BOO 群での MUFA の有意な高値と n-6PUFA の有意な低値が認められた。血漿での脂肪酸組成において、SO 群と比べて BOO 群で有意なステアリン酸とオレイン酸の高値、リノール酸の低値が確認された(Table 5-1-9)。ベヘン酸は BOO 群にのみ検出され、 $0.79 \pm 0.07\%$ であった。SFA および MUFA は SO 群よりも BOO 群で有意な高値、n-6PUFA は有意な低値が認められた。腎臓周囲脂肪および睾丸周囲脂肪において、両者ともに SO 群と比較して BOO 群で有意なパルミチン酸の低値、ステアリン酸、オレイン酸の高値、リノール酸の低値が確認された(Table 5-1-10, 5-1-11)。ベヘン酸は BOO 群にのみ検出され、腎臓周囲脂肪では $0.62 \pm 0.02\%$ 、睾丸周囲脂肪では $0.39 \pm 0.03\%$ 検出された。腎臓周囲および睾丸周囲脂肪共に、BOO 群での MUFA の有意な高値と n-6PUFA の有意な低値が認められた。

3-4. 心臓リン脂質の脂肪酸組成

心臓 PE では、SO 群と比較して BOO 群で有意にパルミチン酸の低値、アラキドン酸の高値、n-3 ドコサペンタエン酸の低値が認められた(Table 5-1-12)。BOO 群のみベヘン酸が $0.17 \pm 0.01\%$ 検出された。n-6PUFA は BOO 群で有意な高値が認められた。心臓 PC では、SO 群と比較して BOO 群での有意なパルミチン酸の低値、ステアリン酸、オレイン酸の高値、n-6 ドコサテトラエン酸および n-3 ドコサペンタエン酸と n-3 ドコサヘキサエン酸の低値が認められた。BOO 群のみベヘン酸が $0.12 \pm 0.02\%$ 検出された。n-3PUFA は BOO 群で有意な高値が認めら

れた。心臓 CL では、BOO 群における有意な n-3 ドコサペンタエン酸の低値が認められた。BOO 群では $0.14 \pm 0.01\%$ のベヘン酸が検出された。SFA、MUFA、PUFA それぞれでは 2 群間で有意な差は認められなかった。心臓 PI では、SO 群と比較して BOO 群で有意なオレイン酸の高値および n-6 ドコサヘキサエン酸の低値が確認された。ベヘン酸は BOO 群の 1 個体のみで検出され、平均すると 0.02% であった。SFA、MUFA、PUFA それぞれでは 2 群間で有意な差は認められなかった。心臓 PS では、ベヘン酸のみ BOO 群で有意な高値が認められたが、それ以外の各脂肪酸や SFA、MUFA、PUFA では 2 群間で有意な差は認められなかった。

4. 考察

本検討では、各組織脂質中の脂肪酸を測定することで、各組織におけるベヘン酸の存在有無について検討した。BOO と同じベヘン酸を含む食事油脂である BOB は GRAS の認証を FDA より取得しており、BOB の安全性について報告している。その報告では、BOB(ベヘン酸含量 6.96%) をラットに 14 日間強制投与した時、死亡例は認められず、また摂食量や体重増加、血液性状への影響はなかった(87)。またサルモネラ属および大腸菌を用いた復帰突然変異テストでは、すべての条件で BOB 添加による突然変異体の増加はなく、変異原性に問題は見られなかった(88)。さらに、カプレニンも GRAS の認証を受けており、91 日間の離乳直後のラットへの摂食試験において、食餌中に 15% のカプレニンが含まれていても、組織重量や血液性状に問題となる変化は認められなかった(42)。この試験より、カプレニンの無毒性量(NOEL)は 15% 以上であると結論付けている。これは食餌中のベヘン酸が 6.75% に相当するが、今回の検討での食餌中のベヘン酸含量は 1.7% と少ない。また第 4 章第 1 節および第 2 節の検討から、血液性状に問題は見られず、BOO は急性毒性や変異原性に影響を与えないことが示唆される。

組織へのベヘン酸の蓄積に関するこれまでの研究結果と本検討の結果を Table 5-1-13 にまとめた。種々のベヘン酸を含む食事油脂の摂取において、肝臓や心臓、腎臓周囲脂肪などにベヘン酸が検出されており、ベヘン酸の摂取量が多くなるにしたがって各組織で検出されるベヘン酸量は多い傾向にあると考えられる(40,42,54,89)。しかし、ここに示した文献では各組織や血液などに異常は認められず、毒性は示さないと考察されている。今回の検討では、2.3%の BOO の摂食により肝臓などの各組織にベヘン酸が検出されたが、ベヘン酸の検出量は他の検討と比較して少ない。これらのことから、BOO は各組織や血液などに異常を示さないことが示唆される。BOO やカプレニンの摂取試験(39-42)でも示されているように、ベヘン酸の吸収率は低く、糞便へと排泄されることが各組織中のベヘン酸が少なかった主な理由と考えられる。また、ベヘン酸のような長鎖飽和脂肪酸は、ペルオキシソームでの β 酸化の主要な役割である生体異物の異化により分解される可能性も示唆される(79-84)。しかしながら、SO 群の食事油脂にはベヘン酸が 0.4%しか含まれていないにも関わらず、一部の組織でベヘン酸が検出されており、恒常的に生体内でベヘン酸を生合成している可能性が考えられ、ベヘン酸は体内に必要な脂肪酸であるかもしれない。

BOO 摂取によるベヘン酸以外の脂肪酸への影響について、多くの組織でリノール酸の割合の低値が認められた(Table 5-1-4～5-1-11)。しかし BOO 群でアラキドン酸の割合は高まっておらず、リノール酸の低値は食事油脂の脂肪酸組成を反映したものであり、食事油脂と組織中の脂肪酸組成は連動するという、これまでの報告で示された傾向と同じであった(90,91)。

心臓の膜脂質を構成する成分の 1 つであるリン脂質は、主に PC および PE が大半を占める(92,93)。これら画分の脂肪酸組成の変化は膜の流動性に大きな影響を与え、飽和脂肪酸が多くなると流動性が低下することが知られている(94)。BOO 摂取によって、各リン脂質画分にベヘン酸が認められたが、心臓リン脂質画分の脂肪酸組成においても、食事油脂の脂肪酸組成と連動しており、BOO が心臓リン脂質画分の脂肪酸組成に影響を与えない可能性が示唆さ

れた。心臓 PS において、BOO 摂取のみならず SO 摂取でもベヘン酸の検出が認められており、心臓 PS には必要な脂肪酸である可能性が考えられる。

心臓リン脂質に特異的に存在する CL はリノール酸が 85% 占める、特徴的な脂肪酸組成を持つリン脂質で、シトクロム c オキシダーゼなど酸化リン酸化に関わっている(95)。そして、心臓 CL の脂肪酸組成の変動も心臓の呼吸機能に影響を及ぼし、リノール酸が減少することでシトクロム c オキシダーゼ活性が有意に低下し、呼吸機能低下を引き起こすことが報告されている(96,97)。しかし、BOO を摂取しても心臓 CL のリノール酸は減少しなかったため(Table 5-1-5)、BOO は心臓 CL の脂肪酸組成に影響を及ぼす可能性は低いと考えられる。

以上より、BOO を摂取することで各組織および心臓リン脂質にベヘン酸が存在することが確認されたが、その量は少ないと考えられた。そして、BOO は各組織の脂肪酸組成に直接影響を与えないと考えられ、BOO の毒性は低いと推察される。

Table 5-1-1 Fatty acid compositions of the test oils

| Fatty acids | SO | BOO |
|-------------|------|------|
| | [%] | |
| 16:0 | 10.4 | 8.6 |
| 16:1 | 0.2 | 0.2 |
| 18:0 | 2.2 | 3.3 |
| 18:1 n-9 | 26.8 | 32.0 |
| 18:2 n-6 | 52.7 | 43.9 |
| 18:3 n-3 | 5.7 | 4.8 |
| 20:0 | 0.5 | 0.9 |
| 22:0 | 0.4 | 5.6 |
| 24:0 | 0.1 | 0.2 |
| unknown | 1.0 | 0.7 |
| SFA | 13.6 | 18.5 |
| MCFA | 27.0 | 32.2 |
| n-6PUFA | 52.7 | 43.9 |
| n-3PUFA | 5.7 | 4.8 |

Table 5-1-2 Body weight and food intake

| | SO | BOO |
|-------------------------|------------|------------|
| Initial body weight [g] | 160 ± 1 | 160 ± 1 |
| Final body weight [g] | 316 ± 4 | 309 ± 4 |
| Food intake [g/day] | 12.9 ± 0.2 | 13.0 ± 0.2 |

Values are means±SE, n=7.

Table 5-1-3 Organ weights

| [g/100g BW] | SO | BOO |
|-----------------------|-------------|---------------|
| Liver | 2.47 ± 0.03 | 2.37 ± 0.04 |
| Kidney | 0.27 ± 0.00 | 0.28 ± 0.00 |
| Spleen | 0.18 ± 0.00 | 0.19 ± 0.00 |
| Heart | 0.26 ± 0.00 | 0.27 ± 0.00 * |
| Lung | 0.30 ± 0.01 | 0.31 ± 0.01 |
| Adipose tissue weight | | |
| Epididymal | 3.14 ± 0.16 | 2.91 ± 0.09 |
| Perirenal | 3.21 ± 0.10 | 2.87 ± 0.11 * |
| Mesenteric | 2.01 ± 0.11 | 1.79 ± 0.08 |
| Total | 8.36 ± 0.36 | 7.57 ± 0.27 |

Values are means±SE, n=7. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 5-1-4 Fatty acid compositions of liver lipid

| Fatty acids | SO | BOO |
|--------------|-------------|---------------|
| | [%] | |
| 16:0 | 17.1 ± 0.3 | 16.6 ± 0.4 |
| 16:1 | 0.81 ± 0.08 | 0.71 ± 0.06 |
| 18:0 | 14.8 ± 0.6 | 17.7 ± 0.7 * |
| 18:1 n-9+n-7 | 12.9 ± 0.9 | 14.1 ± 0.9 |
| 18:2 n-6 | 29.9 ± 1.9 | 23.9 ± 0.9 * |
| 20:4 n-6 | 17.8 ± 0.5 | 19.7 ± 0.6 * |
| 22:0 | 0.10 ± 0.07 | 0.46 ± 0.05 * |
| 22:4 n-6 | 0.56 ± 0.11 | 0.50 ± 0.08 |
| 22:5 n-6 | 0.27 ± 0.04 | 0.28 ± 0.05 |
| 22:5 n-3 | 0.90 ± 0.16 | 0.73 ± 0.09 |
| 22:6 n-3 | 4.98 ± 0.18 | 5.40 ± 0.33 |
| SFA | 31.9 ± 0.9 | 34.7 ± 0.7 * |
| MUFA | 13.7 ± 0.9 | 14.8 ± 0.9 |
| n-6PUFA | 48.5 ± 1.6 | 44.4 ± 0.8 * |
| n-3PUFA | 5.88 ± 0.23 | 6.13 ± 0.40 |

Values are means ± SE, n=7. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 5-1-5 Fatty acid compositions of heart lipid

| Fatty acids | SO | BOO |
|--------------|-------------|---------------|
| | [%] | |
| 16:0 | 11.7 ± 0.2 | 10.3 ± 0.2 * |
| 16:1 | 0.80 ± 0.03 | 0.65 ± 0.09 |
| 18:0 | 20.2 ± 0.6 | 21.3 ± 0.5 |
| 18:1 n-9+n-7 | 13.2 ± 0.6 | 15.5 ± 0.6 * |
| 18:2 n-6 | 26.4 ± 0.9 | 24.2 ± 0.5 |
| 20:4 n-6 | 16.3 ± 0.6 | 17.0 ± 0.5 |
| 22:0 | N.D. | 0.76 ± 0.05 |
| 22:4 n-6 | 0.96 ± 0.04 | 0.81 ± 0.03 * |
| 22:5 n-6 | 0.39 ± 0.03 | 0.39 ± 0.04 |
| 22:5 n-3 | 2.10 ± 0.09 | 1.59 ± 0.08 * |
| 22:6 n-3 | 8.02 ± 0.28 | 7.57 ± 0.25 |
| SFA | 31.9 ± 0.6 | 32.3 ± 0.4 |
| MUFA | 14.0 ± 0.6 | 16.1 ± 0.6 * |
| n-6PUFA | 44.0 ± 0.3 | 42.4 ± 0.2 * |
| n-3PUFA | 10.1 ± 0.4 | 9.16 ± 0.30 |

Values are means ± SE, n=7. N.D.: not detected. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 5-1-6 Fatty acid compositions of kidney lipid

| Fatty acids | SO | BOO |
|--------------|-------------|---------------|
| | [%] | |
| 16:0 | 19.0 ± 0.1 | 18.1 ± 0.1 * |
| 16:1 | 1.06 ± 0.03 | 1.04 ± 0.07 |
| 18:0 | 16.4 ± 0.5 | 16.2 ± 0.3 |
| 18:1 n-9+n-7 | 14.0 ± 0.6 | 17.3 ± 0.5 * |
| 18:2 n-6 | 21.7 ± 0.9 | 20.4 ± 0.5 |
| 20:4 n-6 | 23.8 ± 0.8 | 22.5 ± 0.5 |
| 22:0 | N.D. | 0.57 ± 0.06 |
| 22:4 n-6 | 0.63 ± 0.03 | 0.59 ± 0.03 |
| 22:5 n-6 | 1.40 ± 0.09 | 1.44 ± 0.07 |
| 22:5 n-3 | 0.42 ± 0.03 | 0.33 ± 0.03 * |
| 22:6 n-3 | 1.56 ± 0.04 | 1.56 ± 0.06 |
| SFA | 35.5 ± 0.6 | 34.8 ± 0.3 |
| MUFA | 15.0 ± 0.6 | 18.3 ± 0.5 * |
| n-6PUFA | 47.5 ± 0.1 | 45.0 ± 0.2 * |
| n-3PUFA | 1.98 ± 0.06 | 1.89 ± 0.05 |

Values are means ± SE, n=7. N.D.: not detected. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 5-1-7 Fatty acid compositions of spleen lipid

| Fatty acids | SO | BOO |
|--------------|-------------|---------------|
| | [%] | |
| 16:0 | 20.8 ± 0.6 | 19.8 ± 0.7 |
| 16:1 | 1.68 ± 0.20 | 1.38 ± 0.13 |
| 18:0 | 16.1 ± 0.6 | 15.6 ± 1.1 |
| 18:1 n-9+n-7 | 17.3 ± 0.6 | 22.1 ± 1.6 * |
| 18:2 n-6 | 24.5 ± 1.2 | 23.2 ± 1.9 |
| 20:4 n-6 | 15.4 ± 0.8 | 13.3 ± 1.3 |
| 22:0 | N.D. | 0.96 ± 0.14 |
| 22:4 n-6 | 1.73 ± 0.29 | 1.66 ± 0.15 |
| 22:5 n-6 | 0.52 ± 0.06 | 0.46 ± 0.07 |
| 22:5 n-3 | 1.04 ± 0.07 | 0.74 ± 0.09 * |
| 22:6 n-3 | 0.97 ± 0.07 | 0.85 ± 0.01 |
| SFA | 36.9 ± 1.0 | 36.4 ± 1.9 |
| MUFA | 18.9 ± 0.6 | 23.4 ± 1.6 * |
| n-6PUFA | 42.2 ± 0.7 | 38.6 ± 0.5 * |
| n-3PUFA | 2.01 ± 0.13 | 1.59 ± 0.19 |

Values are means ± SE, n=7. N.D.: not detected. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 5-1-8 Fatty acid compositions of lung lipid

| Fatty acids | SO | BOO |
|--------------|-------------|---------------|
| | [%] | |
| 16:0 | 24.5 ± 0.4 | 23.6 ± 0.4 |
| 16:1 | 2.44 ± 0.06 | 2.79 ± 0.08 * |
| 18:0 | 9.53 ± 0.21 | 10.4 ± 0.2 * |
| 18:1 n-9+n-7 | 21.6 ± 0.3 | 25.2 ± 0.4 * |
| 18:2 n-6 | 30.2 ± 0.7 | 25.2 ± 0.7 * |
| 20:4 n-6 | 6.89 ± 0.21 | 7.21 ± 0.36 |
| 22:0 | 0.66 ± 0.06 | 1.30 ± 0.07 * |
| 22:4 n-6 | 1.96 ± 0.06 | 2.04 ± 0.07 |
| 22:5 n-6 | 0.59 ± 0.04 | 0.80 ± 0.04 * |
| 22:5 n-3 | 0.83 ± 0.04 | 0.76 ± 0.04 |
| 22:6 n-3 | 0.75 ± 0.05 | 0.84 ± 0.04 |
| SFA | 34.7 ± 0.6 | 35.2 ± 0.6 |
| MUFA | 24.1 ± 0.3 | 28.0 ± 0.3 * |
| n-6PUFA | 39.6 ± 0.4 | 35.2 ± 0.3 * |
| n-3PUFA | 1.58 ± 0.08 | 1.60 ± 0.06 |

Values are means ± SE, n=7. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 5-1-9 Fatty acid compositions of plasma lipid

| Fatty acids | SO | BOO |
|--------------|-------------|--------------|
| | [%] | |
| 16:0 | 19.3 ± 0.2 | 19.0 ± 0.3 |
| 16:1 | 1.16 ± 0.12 | 1.34 ± 0.16 |
| 18:0 | 13.9 ± 0.4 | 15.2 ± 0.3 * |
| 18:1 n-9+n-7 | 9.68 ± 0.28 | 11.3 ± 0.3 * |
| 18:2 n-6 | 23.5 ± 0.5 | 20.3 ± 0.5 * |
| 20:4 n-6 | 27.8 ± 0.6 | 27.7 ± 0.4 |
| 22:0 | N.D. | 0.79 ± 0.07 |
| 22:4 n-6 | 0.52 ± 0.05 | 0.52 ± 0.06 |
| 22:5 n-6 | 0.38 ± 0.03 | 0.37 ± 0.06 |
| 22:5 n-3 | 0.78 ± 0.05 | 0.62 ± 0.06 |
| 22:6 n-3 | 3.02 ± 0.18 | 2.95 ± 0.15 |
| SFA | 33.2 ± 0.6 | 34.9 ± 0.5 * |
| MUFA | 10.8 ± 0.3 | 12.6 ± 0.2 * |
| n-6PUFA | 52.2 ± 0.6 | 48.9 ± 0.4 * |
| n-3PUFA | 3.80 ± 0.23 | 3.57 ± 0.20 |

Values are means ± SE, n=7. N.D.: not detected. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 5-1-10 Fatty acid compositions of perirenal adipose tissue lipid

| Fatty acids | SO | BOO |
|--------------|-------------|---------------|
| | [%] | |
| 16:0 | 16.3 ± 0.2 | 15.1 ± 0.2 * |
| 16:1 | 1.37 ± 0.09 | 1.33 ± 0.07 |
| 18:0 | 3.28 ± 0.07 | 4.10 ± 0.12 * |
| 18:1 n-9+n-7 | 31.1 ± 0.2 | 38.2 ± 0.3 * |
| 18:2 n-6 | 47.6 ± 0.4 | 40.3 ± 0.1 * |
| 20:4 n-6 | 0.38 ± 0.02 | 0.35 ± 0.02 |
| 22:0 | N.D. | 0.62 ± 0.02 |
| SFA | 19.6 ± 0.2 | 19.9 ± 0.2 |
| MUFA | 32.5 ± 0.3 | 39.5 ± 0.2 * |
| n-6PUFA | 48.0 ± 0.4 | 40.6 ± 0.1 * |
| n-3PUFA | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |

Values are means ± SE, n=7. N.D.: not detected. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 5-1-11 Fatty acid compositions of epididymal adipose tissue lipid

| Fatty acids | SO | BOO |
|--------------|-------------|---------------|
| | [%] | |
| 16:0 | 16.2 ± 0.2 | 15.2 ± 0.1 * |
| 16:1 | 1.65 ± 0.13 | 1.74 ± 0.09 |
| 18:0 | 3.00 ± 0.06 | 3.69 ± 0.05 * |
| 18:1 n-9+n-7 | 30.4 ± 0.1 | 37.4 ± 0.2 * |
| 18:2 n-6 | 48.2 ± 0.3 | 41.1 ± 0.2 * |
| 20:4 n-6 | 0.58 ± 0.05 | 0.50 ± 0.06 |
| 22:0 | N.D. | 0.39 ± 0.03 |
| SFA | 19.2 ± 0.2 | 19.3 ± 0.1 |
| MUFA | 32.1 ± 0.2 | 39.1 ± 0.2 * |
| n-6PUFA | 48.8 ± 0.3 | 41.6 ± 0.2 * |
| n-3PUFA | 0.00 ± 0.00 | 0.00 ± 0.00 |

Values are means ± SE, n=7. N.D.: not detected. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 5-1-12 Fatty acid compositions of phospholipids fractions in heart from rats fed the test diets

| Fatty acids | PE | | PC | | CL | |
|--------------|-------------|---------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | SO | BOO | SO | BOO | SO | BOO |
| | [%] | | | | | |
| 16:0 | 8.79 ± 0.22 | 7.90 ± 0.07 * | 13.6 ± 0.2 | 12.1 ± 0.2 * | 1.46 ± 0.19 | 1.29 ± 0.10 |
| 16:1 | 0.72 ± 0.11 | 0.72 ± 0.05 | 0.71 ± 0.13 | 0.60 ± 0.14 | 1.22 ± 0.44 | 1.02 ± 0.23 |
| 18:0 | 28.0 ± 0.5 | 28.2 ± 0.5 | 31.7 ± 0.4 | 34.1 ± 0.2 * | 1.60 ± 0.19 | 1.46 ± 0.09 |
| 18:1 n-9+n-7 | 6.80 ± 0.18 | 7.15 ± 0.13 | 5.57 ± 0.12 | 5.91 ± 0.08 * | 7.52 ± 0.26 | 7.05 ± 0.19 |
| 18:2 n-6 | 5.54 ± 0.10 | 5.19 ± 0.15 | 8.20 ± 0.24 | 7.96 ± 0.31 | 82.7 ± 0.5 | 84.1 ± 0.5 |
| 20:4 n-6 | 17.2 ± 0.2 | 18.8 ± 0.3 * | 32.0 ± 0.3 | 32.9 ± 0.3 | 1.77 ± 0.11 | 1.79 ± 0.08 |
| 22:0 | N.D. | 0.17 ± 0.01 | N.D. | 0.12 ± 0.02 | N.D. | 0.14 ± 0.01 |
| 22:4 n-6 | 1.66 ± 0.04 | 1.56 ± 0.03 | 0.75 ± 0.02 | 0.62 ± 0.02 * | 0.21 ± 0.05 | 0.12 ± 0.02 |
| 22:5 n-6 | 1.01 ± 0.05 | 1.01 ± 0.04 | 0.22 ± 0.02 | 0.19 ± 0.04 | 0.22 ± 0.08 | 0.10 ± 0.02 |
| 22:5 n-3 | 3.39 ± 0.08 | 2.76 ± 0.05 * | 2.15 ± 0.07 | 1.46 ± 0.06 * | 0.71 ± 0.07 | 0.53 ± 0.04 * |
| 22:6 n-3 | 26.9 ± 0.5 | 26.5 ± 0.5 | 5.24 ± 0.13 | 4.12 ± 0.16 * | 2.63 ± 0.18 | 2.45 ± 0.18 |
| SFA | 36.8 ± 0.6 | 36.3 ± 0.6 | 45.2 ± 0.5 | 46.3 ± 0.3 | 3.05 ± 0.36 | 2.88 ± 0.16 |
| MUFA | 7.52 ± 0.17 | 7.87 ± 0.11 | 6.28 ± 0.23 | 6.51 ± 0.13 | 8.74 ± 0.42 | 8.07 ± 0.25 |
| n-6PUFA | 25.4 ± 0.3 | 26.6 ± 0.4 * | 41.1 ± 0.4 | 41.7 ± 0.3 | 84.9 ± 0.6 | 86.1 ± 0.4 |
| n-3PUFA | 30.3 ± 0.6 | 29.2 ± 0.5 | 7.38 ± 0.18 | 5.58 ± 0.20 * | 3.33 ± 0.23 | 2.98 ± 0.22 |

| Fatty acids | PI | | PS | |
|--------------|-------------|---------------|-------------|---------------|
| | SO | BOO | SO | BOO |
| | [%] | | | |
| 16:0 | 4.13 ± 0.23 | 3.80 ± 0.22 | 5.93 ± 0.38 | 4.37 ± 0.27 |
| 16:1 | 2.00 ± 0.31 | 1.82 ± 0.47 | 2.44 ± 0.52 | 1.60 ± 0.35 |
| 18:0 | 43.4 ± 1.2 | 43.5 ± 1.1 | 44.6 ± 1.5 | 43.5 ± 0.3 |
| 18:1 n-9+n-7 | 5.44 ± 0.29 | 6.38 ± 0.21 * | 9.06 ± 0.53 | 9.76 ± 0.61 |
| 18:2 n-6 | 6.37 ± 0.49 | 6.31 ± 1.08 | 3.70 ± 0.32 | 3.59 ± 0.32 |
| 20:4 n-6 | 33.3 ± 0.6 | 32.9 ± 0.0 | 9.04 ± 0.52 | 8.26 ± 0.33 |
| 22:0 | N.D. | 0.02 ± 0.02 | 1.29 ± 0.20 | 2.45 ± 0.32 * |
| 22:4 n-6 | N.D. | N.D. | 2.79 ± 0.24 | 3.00 ± 0.10 |
| 22:5 n-6 | 0.73 ± 0.05 | 0.55 ± 0.06 * | 1.06 ± 0.15 | 1.02 ± 0.16 |
| 22:5 n-3 | 2.13 ± 0.15 | 1.80 ± 0.06 | 2.65 ± 0.19 | 2.68 ± 0.21 |
| 22:6 n-3 | 2.51 ± 0.16 | 2.89 ± 0.46 | 18.1 ± 1.2 | 19.7 ± 1.0 |
| SFA | 47.5 ± 1.1 | 47.4 ± 0.9 | 51.2 ± 1.7 | 50.4 ± 0.6 |
| MUFA | 7.44 ± 0.44 | 8.21 ± 0.54 | 11.5 ± 0.5 | 11.4 ± 0.8 |
| n-6PUFA | 40.4 ± 0.7 | 39.8 ± 1.0 | 16.6 ± 0.7 | 15.9 ± 0.3 |
| n-3PUFA | 4.64 ± 0.28 | 4.69 ± 0.45 | 20.7 ± 1.3 | 22.4 ± 1.2 |

Values are means±SE, n=7 (n=6 at PS and PI fractions of SO group, n=5 at PS fraction of BOO group). N.D.: not detected. * indicates significant differences for the SO group (Student's *t*-test, *P*<0.05). PE: phosphatidylethanolamine, PC: phosphatidylcholine, CL: cardiolipin, PI: phosphatidylinositol, PS: phosphatidylserine

Table 5-1-13 Behenic acid contents of each tissue in rats fed the dietary oil containing behenic acid

| Dietary oils | behenic acid content | Organs | behenic acid content |
|-------------------------------------|----------------------|-------------------|----------------------|
| Caprenin ⁴⁰ | 4.2% | Liver | 0.49% |
| | | Heart | 0.94% |
| | | Perirenal fat pad | 1.27% |
| Caprenin ⁴² | 6.75% | Liver | trace |
| | | Perirenal fat pad | 0.66% |
| 2-Behenoyl dilinolein ⁵⁴ | 7.5% | Liver | 1.3% |
| | | Heart | 3.8% |
| Hydrogenated fish oil ⁸⁹ | 7.5% | Serum | 1.0% |
| BOO | 1.7% | Liver | 0.46% |
| | | Heart | 0.76% |
| | | Perirenal fat pad | 0.62% |

Number of superscript indicates the reference number.

第5章 第2節 BOO 摂取後の血漿および肝臓ベヘン酸の挙動に

についての検証

1. 目的

ラットを用いたリンパカニュレーション試験で BOO を胃内投与した場合、リンパ液にベヘン酸が 72.3% 吸収されることを見出した。また血漿や各組織脂質中の脂肪酸組成は、BOO を含む食事油脂の脂肪酸組成を反映し、血漿や各組織にベヘン酸が検出された。ベヘン酸を含む他の食事油脂を摂取させた報告においても、血中や肝臓、脂肪組織にベヘン酸が存在することが示されている(40,42,54,89)。一方で、摂取したベヘン酸は、 β 酸化によりパルミチン酸やステアリン酸へと分解されるとの報告もある(85)。そこで、BOO 高含有油脂を連続摂取させた後、コントロール油脂に戻してから一定期間内のベヘン酸の挙動について、血漿および肝臓脂質中のベヘン酸を測定した。

2. 実験材料および方法

2-1. BOO 高含有油脂の作製および食餌組成

BOO 高含有油脂は、第4章第1節 2-1 で示した方法で調製した。ここで使用した BOO 高含有油脂中の BOO 含量は 41.8% であった。

食餌組成は、AIN-93G 組成に基づき、第4章第1節 2-2 Table 4-1-3 とすべて同じ食餌組成とした(食事油脂含量 28%)。また、BOO 群は SO の 20% を BOO 高含有油脂に置換した。

2-2. 実験動物および飼育、解剖および組織摘出

実験動物および飼育は、第4章第1節2-3に示した方法で実施した。予備飼育終了後のラットにBOO食を6週間摂取させた。6週間の摂取期間の終了をDay 0とし、ランダムにラットを3匹選び、絶食後に屠殺した。残りのラットにはSO食に切り替え、摂取させた。SO食摂取1日目・3日目・7日目・14日目において、ランダムにラットを3匹ずつ選び、絶食後に屠殺した。絶食時間は8:00より6時間とした。絶食後、イソフルランによるガス麻酔を行った。無痛条件下で開腹し、ヘパリン処理したシリンジを用いて下大動脈より採血、屠殺した後、肝臓を摘出した。血漿の処理は第4章第1節2-4の方法で行った。血漿および肝臓は分析まで-80℃で保存した。

2-3. 血漿および肝臓脂質の脂肪酸分析

血漿および肝臓からの脂質の抽出は、第4章第1節2-6-1の方法を用いた。得られた脂質中の脂肪酸分析は、第3章第1節2-4の方法で行った。

2-4. 統計解析

データは平均値±SEで示した。Day 0とDay 14における血漿および肝臓脂質中の脂肪酸組成の統計解析はStudent's *t*-test ($P<0.05$)で行った。

3. 結果

3-1. 体重の推移

BOO摂取終了直後のDay 0での体重は313±4gであった(Table 5-1-1)。その後、摂取期間が長くなるにつれて、体重は増加した。

3-2. 血漿および肝臓脂質中のベヘン酸の変化

BOO 摂取終了直後の Day 0 から Day 14 までの血漿脂質中のベヘン酸を示した(Figure 5-1-1)。Day 0 時における血漿脂質中のベヘン酸の平均値は $0.79 \pm 0.02\%$ であった。Day 1 では $0.33 \pm 0.13\%$ 、Day 3 では $0.18 \pm 0.04\%$ のベヘン酸が検出された。Day 7 の $n=3$ での血漿脂質中のベヘン酸の平均値は $0.63 \pm 0.34\%$ であったが、それぞれ 0.36%、0.21%、1.31%と、3 個体中 1 個体でベヘン酸が高かった。Day 14 における血漿脂質中のベヘン酸の平均値は $0.19 \pm 0.01\%$ であった。

Day 0 から Day 14 における肝臓脂質中のベヘン酸を示した(Figure 5-1-2)。Day 0 時の肝臓脂質中のベヘン酸の平均値は $0.24 \pm 0.03\%$ 、Day 1 では $0.17 \pm 0.00\%$ 、Day 3 では $0.09 \pm 0.00\%$ 、Day 7 では $0.09 \pm 0.00\%$ であった。Day 14 の肝臓脂質サンプルは 2 個体のみであったが、それぞれのベヘン酸は 0.09%と 0.06%であった。

3-3. Day 0 および Day 14 における血漿および肝臓脂質の脂肪酸組成

Day 0 および Day 14 での血漿脂質の脂肪酸組成の比較において、Day 14 でベヘン酸が有意に低く、パルミチン酸が有意に高かった(Table 5-1-2)。それ以外の脂肪酸は 2 群間で有意な差は認められなかった。

肝臓脂質の脂肪酸組成において、Day 0 と比較して、Day 14 でベヘン酸が有意に低く、リノール酸が有意に高かった(Table 5-1-3)。それ以外の脂肪酸は 2 群間で有意な差は認められなかった。

4. 考察

BOO 摂取による血漿および各組織脂質中のベヘン酸の挙動を把握するため、6 週間 BOO を連続的に摂取させた後、SO 食に切り替えて一定期間内の血漿および肝臓脂質に検出されるベヘン酸の経時変化を確認した。6 週間の BOO 摂取時の血漿および肝臓脂質中の脂肪酸組成は前節で示した結果と同傾向であり、食餌中に 1.7%のベヘン酸が含まれると、血漿脂質中に 0.8%前後、肝臓脂質中には 0.2%前後のベヘン酸が存在することが再確認された(Table 5-1-2, 5-1-3)。Granlund らは、魚油を完全に硬化した油脂をラットに 4 週間摂取させた時の血清脂質中の脂肪酸組成を測定している(89)。この検討では、ベヘン酸が食餌中に 7.5%含まれる食餌を摂取させた時、血清脂質中にベヘン酸が 1.0%検出された。また部分的に魚油を硬化した場合においても(食餌中のベヘン酸含量 1.0%)、血清脂質中には 0.3%のベヘン酸が存在していた。肝臓脂質中のベヘン酸についても、他の研究結果から、最大で 1.3%のベヘン酸の検出が認められている(40,54)。今回の検討も含め、いずれの試験条件の場合も、摂取ベヘン酸と血中や肝臓ベヘン酸との間に量的な相関は認められないが、BOO の連続摂取により、血中や肝臓にベヘン酸が検出されることが示された。

BOO 連続摂取後の SO 食への切り替えは、3 日目までに血漿脂質中のベヘン酸を速やかに減少させ、3 日目の血漿脂質中のベヘン酸は 0 日目の 22.3%まで低下した(Figure 5-1-1)。3 日目以降もベヘン酸が減少する傾向が確認された。SO 食摂取 0 日目と 14 日目を比較すると、14 日目においてベヘン酸が有意に低下し(Table 5-1-2)、14 日目の血漿脂質の脂肪酸組成は、前節で報告した SO 群の脂肪酸組成に近似していた。血漿脂質で見られた SO 食への切り替えによるベヘン酸の速やかな減少は肝臓脂質においても認められ、切り替え 3 日目には 0 日目の 37.5%までベヘン酸が減少した(Figure 5-1-2, Table 5-1-3)。切り替え直後より生じたベヘン酸の減少は、食餌からのベヘン酸の吸収が無くなったことで、カイロミクロン-TAG 中のベヘ

ン酸の減少が起こり、肝臓に流入するベヘン酸が減少したことに加えて、ベヘン酸が速やかに異化されることによると推察される。

SO 食に切り替えた後 14 日目においても、血漿や肝臓脂質中のベヘン酸が完全に消失することはなかった(Table 5-1-2, 5-1-3)。前節の検討において、SO 食中には 0.4%のベヘン酸が含まれ、その摂取により肝臓を始めとする複数の組織でベヘン酸が認められた。また Granlund らの検討においても、SO の摂取(食餌中のベヘン酸含量 0.3%)によって、血清脂質中に 0.4%のベヘン酸が検出されている(89)。SO 食に切り替え後 14 日目の血漿や肝臓で認められたベヘン酸は、SO のような一般的な食事油脂を摂取していても、ある程度検出されるレベルで留まる可能性が考えられた。今後、n 数確保による精度の向上を図ると共に、より長期間の SO 食摂取によるベヘン酸の消失とその影響を詳細に検討する必要があると考えられる。

5. 小括

本章では、BOO の安全性の検証として、BOO 摂取時の各組織におけるベヘン酸の検出有無を確認した。各組織および心臓リン脂質画分の脂肪酸組成は BOO 食の脂肪酸組成を反映し、ベヘン酸が検出されることが示された。ベヘン酸を含む低吸収性構造脂質の研究結果と比較すると、今回検出されたベヘン酸は少なく、また GRAS の認証を取得している BOB やカプレニンの安全性の結果から、BOO の毒性は低いと推察された。BOO 摂取時の各組織に認められたベヘン酸に対し、SO 摂取に切り替えた後のベヘン酸の挙動を調べた。BOO 食から SO 食への切り替え後 3 日目までに血漿や肝臓からベヘン酸が速やかに減少し、14 日目には SO 食の摂取でも検出されるレベルで留まる可能性が考えられた。この現象は、BOO の摂取中止による血中や肝臓へのベヘン酸の吸収量の低下とベヘン酸の異化によるものと示唆される。

Table 5-1-1 Changes of body weight

| | Day 0 | Day 1 | Day 3 | Day 7 | Day 14 |
|-----------------|---------|---------|---------|---------|----------|
| n | 15 | 12 | 9 | 6 | 3 |
| Body weight [g] | 313 ± 4 | 316 ± 4 | 320 ± 3 | 330 ± 5 | 344 ± 12 |

Values are means±SE.

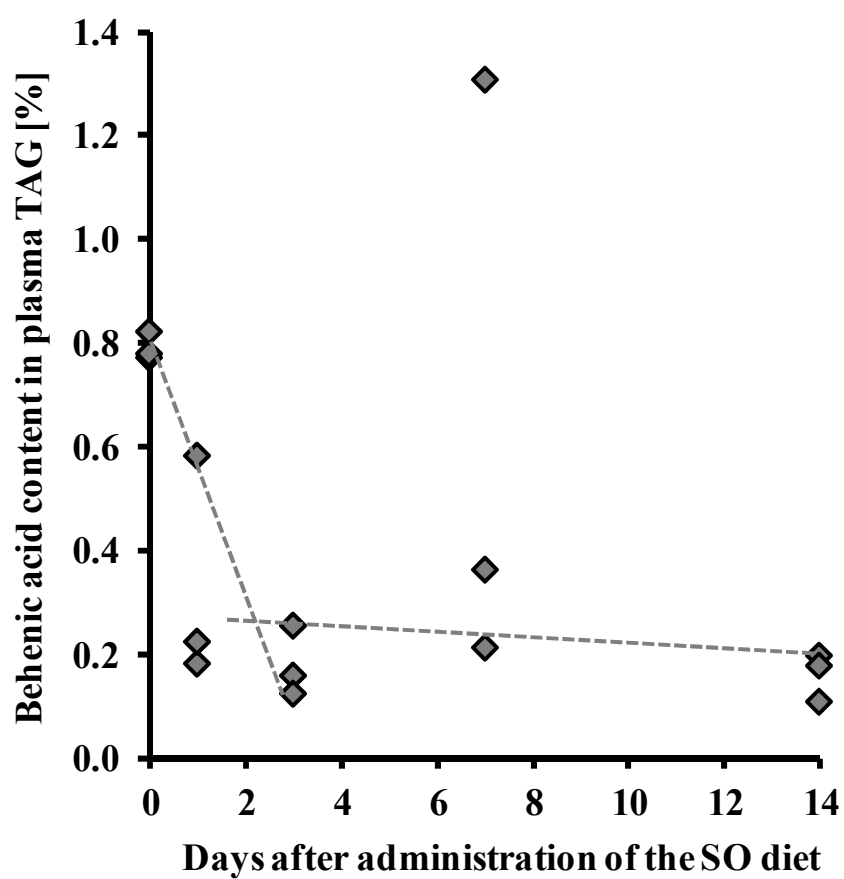


Figure 5-1-1 Changes of behenic acid content in plasma TAG after switching to the SO diet

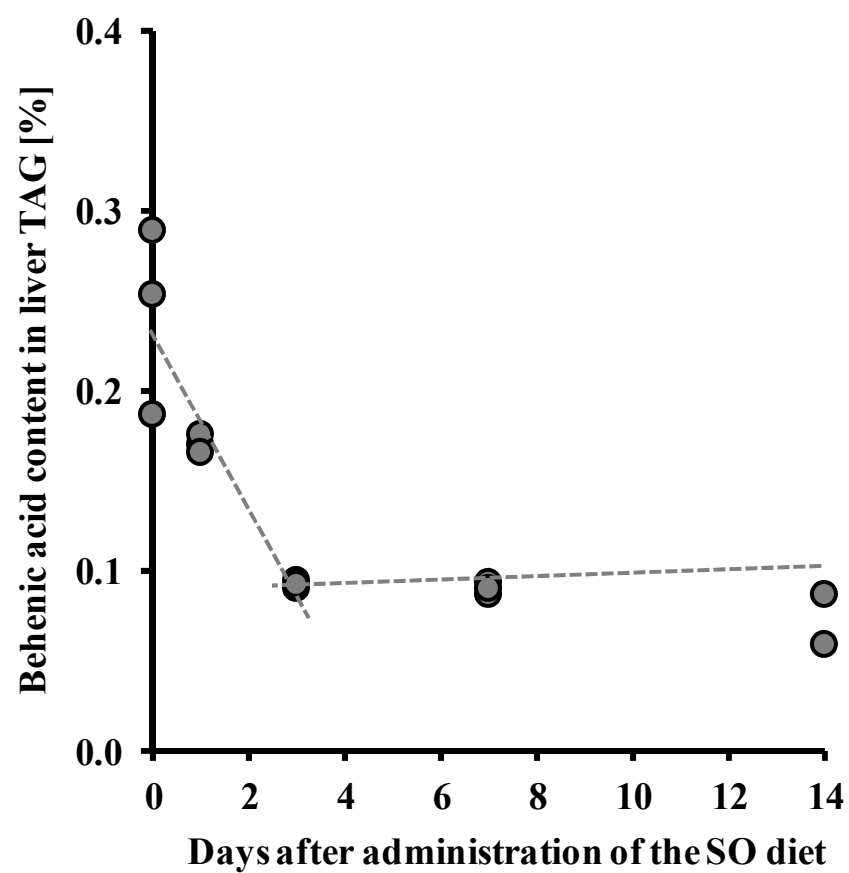


Figure 5-1-2 Changes of behenic acid content in liver TAG after switching to the SO diet

Table 5-1-2 Fatty acid compositions of plasma lipid at Day 0 and Day 14

| Fatty acids | Day 0 | Day 14 |
|--------------|-------------|---------------|
| | [%] | |
| 16:0 | 14.2 ± 0.1 | 15.8 ± 0.1 * |
| 18:0 | 14.6 ± 0.2 | 14.4 ± 0.3 |
| 18:1 n-9+n-7 | 12.8 ± 0.2 | 11.2 ± 0.3 |
| 18:2 n-6 | 25.0 ± 0.9 | 26.7 ± 0.4 |
| 20:4 n-6 | 29.3 ± 1.1 | 28.8 ± 0.1 |
| 22:0 | 0.79 ± 0.02 | 0.19 ± 0.01 * |
| 22:6 n-3 | 3.24 ± 0.06 | 2.91 ± 0.13 |

Values are means±SE, n=3. * indicates significant differences for the group of Day 0 (Student's *t*-test, *P*<0.05).

Table 5-1-3 Fatty acid compositions of liver lipid at Day 0 and Day 14

| Fatty acids | Day 0 | Day 14 |
|--------------|-------------|---------------|
| | [%] | |
| 16:0 | 16.9 ± 0.8 | 17.0 ± 0.9 |
| 18:0 | 13.9 ± 0.6 | 12.4 ± 0.4 |
| 18:1 n-9+n-7 | 18.5 ± 1.2 | 16.4 ± 0.3 |
| 18:2 n-6 | 28.3 ± 0.3 | 34.0 ± 0.4 * |
| 20:4 n-6 | 17.3 ± 1.0 | 15.8 ± 0.4 |
| 22:0 | 0.24 ± 0.03 | 0.07 ± 0.01 * |
| 22:6 n-3 | 4.85 ± 0.39 | 4.28 ± 0.00 |

Values are means±SE, n=3 (Day 0), n=2 (Day 14). * indicates significant differences for the group of Day 0 (Student's *t*-test, *P*<0.05).

第 6 章 総括

メタボリックシンドロームの根底には肥満があり、肥満抑制の 1 つの方法として食事油脂の吸収抑制が考えられる。食事油脂の吸収を抑制するには、膵リパーゼにより加水分解されにくい TAG の利用は有効な手段である。過去の知見より、鎖長の長い飽和脂肪酸を含む TAG、特にベヘン酸を含む TAG は加水分解されにくい可能性が考えられ、肥満を改善できる実用性のある難消化性構造脂質を期待し、次のような研究を行った。

第 2 章では、膵リパーゼによるベヘン酸を含む TAG の加水分解速度を調べることで、難消化性構造脂質の検証を行うこととした。その結果、ベヘン酸を含む TAG はパルミチン酸やステアリン酸を含む TAG よりも顕著に加水分解速度が抑制されることを示した。ベヘン酸を含む TAG の加水分解速度の低下には、ベヘン酸という鎖長の長い脂肪酸が結合していることによる高融点性や立体構造が影響していると考えられた。難消化性構造脂質の候補として、汎用性の点から TAG の融点が 37℃以下であること、少量の利用であること、食経験の点からは天然油脂に含まれる TAG であることや生産効率が高い TAG であることが望ましい。この観点より、BOO が難消化性構造脂質の候補として有効であると考えた。

第 3 章では、BOO の低吸収性を胸管リンパカニュレーション試験で示した。これに加え、BOO は共存する OOO の吸収を遅延・抑制させることを明らかにした。膵リパーゼによる BOO 自身の加水分解に時間がかかり、そのことで共存する OOO が膵リパーゼと接触する機会が減少するため、吸収が遅延・抑制されたと推察される。BOO は自身の低吸収性と共存する食事油脂の吸収遅延・抑制の両方の作用を有するという、これまでの低吸収性の構造脂質には見られない作用を有することを見出し、BOO は肥満や脂質代謝の予防・改善に有効である可能性が考えられた。

第4章では、肥満や脂質代謝に対する BOO の有効性を、ラットおよびヒトを用いて検討した。BOO は糞便への脂肪排泄を増加させ、その排泄増加がベヘン酸だけではなくベヘン酸以外の脂肪酸にまで及ぶことを明らかにした。また、BOO 摂取は血漿および肝臓 TAG 濃度、内臓脂肪を減少させることを確認した。また、BOO を用いた別のヒト試験において、食後の血清 TAG 濃度の上昇が抑制されること、カイロミクロン-TAG の曲線下面積が低下することが分かっている(60)。これらから、腓リパーゼによる BOO の加水分解が抑制されることで、リンパでの TAG の吸収が遅延・抑制され、カイロミクロンに取り込まれる TAG 量が減少すると考えられた。結果として肝臓へ流入する TAG 量も減少したと推察された。カイロミクロンに取り込まれる TAG 量の減少により、リポタンパク質リパーゼによる加水分解で生成される脂肪酸量が減少すること、また食事油脂の吸収量低下に伴い、カロリー摂取量が低下することにより、内臓脂肪の蓄積が抑制されたと考えられた。肝臓 TAG 濃度の低下に対し、BOO は肝臓での脂肪酸合成系酵素の活性抑制への関与はほとんどなかった。また、 β 酸化系酵素の活性亢進にわずかに影響する傾向が認められたが、これはベヘン酸を迅速に分解するためと考えられ、肝臓 TAG 濃度の低下の主要因は食事油脂の吸収遅延・抑制であることが推察された。

BOO を食品素材として利用していくにあたり、第5章では BOO の安全性について検証した。BOO 摂取による体内でのベヘン酸の存在有無について、各組織中のベヘン酸を測定した。BOO の摂取で各組織にベヘン酸が存在したが、ベヘン酸を含む低吸収性構造脂質を摂取した時の残存性と比較すると(40,42,54,89)、本検討で検出されたベヘン酸は少量であった。GRAS の認証を取得している BOB やカプレニンの安全性の検証結果やカプレニンの無毒性量が食事中の 15%以上であることから(42,87,88)、BOO の毒性は低いと推察された。さらに、6 週間の BOO 摂取後のベヘン酸の挙動について、SO 食に切り替えた時の血漿および肝臓中のベヘン酸を測定した。BOO を摂取しなくなることで、血漿および肝臓脂質に含まれていたベヘン酸が速やかに減少し、14 日目には SO 食摂取時に検出されるレベルでベヘン酸が留まる

可能性が考えられた。ベヘン酸の速やかな減少は、BOO の摂取を中止したことによる血中や肝臓へのベヘン酸の吸収量の低下と、ベヘン酸の異化によるものと考えられる。BOO の安全性については、今後も詳細な検討が必要である。

一連の検討により、腓リパーゼによる BOO の加水分解が抑制されることで、リンパへのそれ自身の吸収が抑制され、BOO 自身が難消化性の構造脂質であることを示した。さらに BOO は低吸収であるだけでなく、BOO 以外の食事油脂の吸収を抑制することを明らかにした。

BOO の継続的な摂取により、肥満や脂質異常症の改善が得られることが示唆され、BOO は肥満抑制が期待できる難消化性構造脂質であると結論した。これまで開発された構造脂質と異なり、BOO は食事脂肪の吸収を大きく阻害することなく、また、下痢などの副作用も生じない安全性の高い構造脂質である。物性面においても、BOO は融点が 30.9℃と低く、一般油脂への混合も容易な食事油脂である。以上より、BOO は肥満を改善・予防する効果が期待でき、且つ汎用性も優れた食事油脂と言える。

引用文献

- (1) Bray G.A., Popkin B.M. Dietary fat intake does affect obesity! *Am. J. Clin. Nutr.* **1998**, 68, 1157-1173
- (2) Matsuzawa Y., Shimomura I., Nakamura T., Keno Y., Tokunaga K. Pathophysiology and pathogenesis of visceral fat obesity. *Diabetes Research and Clinical Practice* **1994**, 24, S1111-S1116
- (3) Kumada M., Kihara S., Sumitsuji S., Kawamoto Y., Matsumoto S., Ouchi N., Arita Y., Okamoto Y., Shimomura I., Hiraoka H., Nakamura T., Funahashi T., Matsuzawa Y. Association of Hypoadiponectinemia With Coronary Artery Disease in Men. *Arterioscler Thromb. Vasc. Biol.* **2003**, 23, 85-89
- (4) Okamoto Y., Kihara S., Funahashi T., Matuzawa Y., Libby P. Adiponectin: a key adipocytokine in metabolic syndrome. *Clinical Science* **2006**, 110, 267-278
- (5) Zimmet P., Magliano D., Matsuzawa Y., Alberti G, Shaw J. The metabolic syndrome: a global public health problem and a new definition. *J Atheroscler Thromb.* **2005**, 12, 295-300
- (6) Astrup A. The role of dietary fat in obesity. *Semin. Vasc. Med.* **2005**, 5, 40-47
- (7) Grundy SM. Obesity, metabolic syndrome, and cardiovascular disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2004**, 89, 2595-2600
- (8) 平成 23 年度国民健康・栄養調査結果の概要 厚生労働省
- (9) 健康日本 21(第 1 次) 厚生労働省
- (10) 日本人の食事摂取基準(2010 年度版) 厚生労働省
- (11) 池田郁男, 菅野道廣. 脂質転送機能の調節. *メビオ* **1993**, 10, 16-22
- (12) Borgström B., Mode of action of tetrahydrolipstatin: a derivative of the naturally occurring lipase inhibitor lipstatin. *Biochim. Biophys. Acta* **1998**, 962, 308-316
- (13) Hadváry P., Lengsfeld H., Wolfer H. Inhibition of pancreatic lipase in vitro by the covalent inhibitor tetrahydrolipstatin. *Biochem. J.* **1988**, 256, 357-361
- (14) Davidson M.H., Hauptman J., DiGirolamo M., Foreyt J.P., Halsted C.H., Heber D., Heimbarger D.C., Lucas C.P., Robbins D.C., Chung J., Heymsfield S.B. Weight control and risk factor reduction in obese subjects treated for 2 years with orlistat: a randomized controlled trial. *JAMA.* **1999**, 281, 235-242
- (15) Sjöström L., Rissanen A., Andersen T., Boldrin M., Golay A., Koppeschaar H.P., Krempf M. Randomised placebo-controlled trial of orlistat for weight loss and prevention of weight regain in obese patients. European Multicentre Orlistat Study Group. *Lancet* **1998**, 352, 167-172

- (16) Hollander P.A., Elbein S.C., Hirsch I.B., Kelley D., McGill J., Taylor T., Weiss S.R., Crockett S.E., Kaplan R.A., Comstock J., Lucas C.P., Lodewick P.A., Canovatchel W., Chung J., Hauptman J. Role of orlistat in the treatment of obese patients with type 2 diabetes. A 1-year randomized double-blind study. *Diabetes Care* **1998**, 21, 1288-1294
- (17) Filippatos T.D., Derdemezis C.S., Gazi I.F., Nakou E.S., Mikhailidis D.P., Elisaf M.S. Orlistat-associated adverse effects and drug interactions: a critical review. *Drug Saf.* **2008**, 31, 53-65
- (18) Lucas K.H., Kaplan-Machlis B. Orlistat--a novel weight loss therapy. *Ann. Pharmacother.* **2001**, 35, 314-328
- (19) Hartmann D., Hussain Y., Guzelhan C., Odink J. Effect on dietary fat absorption of orlistat, administered at different times relative to meal intake. *Br. J. Clin. Pharmac.* **1993**, 36, 266-270
- (20) Zhi J., Moore R., Kanitra L. The effect of short-term (21-day) orlistat treatment on the physiologic balance of six selected macrominerals and microminerals in obese adolescents. *J. Am. Coll. Nutr.* **2003**, 22, 357-362
- (21) Carrière F., Renou C., Ransac S., Lopez V., De Caro J., Ferrato F., De Caro A., Fleury A., Sanwald-Ducray P., Lengsfeld H., Beglinger C., Hadvary P., Verger R., Laugier R. Inhibition of gastrointestinal lipolysis by Orlistat during digestion of test meals in healthy volunteers. *Am. J. Physiol. Gastrointest Liver Physiol.* **2001**, 281, G16-G28
- (22) Ikeda I., Tsuda K., Suzuki Y., Kobayashi M., Unno T., Tomoyori H., Goto H., Kawata Y., Imaizumi K., Nozawa A., Kakuda T. Tea catechins with a galloyl moiety suppress postprandial hypertriacylglycerolemia by delaying lymphatic transport of dietary fat in rats. *J. Nutr.* **2005**, 135, 155-159
- (23) Unno T., Osada C., Motoo Y., Suzuki Y., Kobayashi M., Nozawa A. Dietary tea catechins increase fecal energy in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol (Tokyo)*. **1999**, 55, 447-451
- (24) Nakai M., Fukui Y., Asami S., Toyoda-Ono Y., Iwashita T., Shibata H., Mitsunaga T., Hashimoto F., Kiso Y. Inhibitory effects of oolong tea polyphenols on pancreatic lipase in vitro. *J. Agric. Food Chem.* **2005**, 53, 4593-4598
- (25) Toyoda-Ono Y., Yoshimura M., Nakai M., Fukui Y., Asami S., Shibata H., Kiso Y., Ikeda I. Suppression of postprandial hypertriglyceridemia in rats and mice by oolong tea polymerized polyphenols. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2007**, 71, 971-976
- (26) Hsu T.F., Kusumoto A., Abe K., Hosoda K., Kiso Y., Wang M.F., Yamamoto S. Polyphenol-enriched oolong tea increases fecal lipid excretion. *Eur. J. Clin. Nutr.* **2006**, 60, 1330-1336
- (27) Aoyama T., Fukui K., Taniguchi K., Nagaoka S., Yamamoto T., Hashimoto Y. Effect of dietary calcium on the absorption of triglycerides esterified at 1,2 and 1,3 positions of

- glycerol with long chain saturated fatty acids in rats. *Nutrition Research* **1995**, 15, 1005-1018
- (28) Aoyama T., Fukui K., Taniguchi K., Nagaoka S., Yamamoto T., Hashimoto Y. Absorption and metabolism of lipids in rats depend on fatty acid isomeric position. *J. Nutr.* **1996**, 126, 225-231
 - (29) Mattson F.H., Nolen G.A., Webb M.R. The absorbability by rats of various triglycerides of stearic and oleic acid and the effect of dietary calcium and magnesium. *J. Nutr.* **1979**, 109, 1682-1687
 - (30) Cistola D.P., Atkinson D., Hamilton J.A. Small D.M. Phase behavior and bilayer properties of fatty acids: hydrated 1:1 acid-soaps. *Biochemistry* **1986**, 25, 2804-2812
 - (31) Entressangles B., Pasero L., Savary P., Sarda L., Desnuelle P. Influence de la nature des chaînes sur la vitesse de leur hydrolyse par la lipase pancréatique. *Bull. Soc. Chim. Biol.* **1961**, 43, 581-585
 - (32) Mattson F.H., Volpenhein R.A. The digestion and absorption of triglycerides. *J. Biol. Chem.* **1964**, 239, 2772-2777
 - (33) Small D.M. The effects of glyceride structure on absorption and metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **1991**, 11, 413-434
 - (34) Mu H., Porsgaard T. The metabolism of structured triacylglycerols. *Prog. Lipid Res.* **2005**, 44, 430-448
 - (35) Hayes J.R., Finley J.W., Leveille G.A. In vivo metabolism of Salatrim fats in the rat. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 500-514
 - (36) Finley J.W., Leveille G.A., Dixon R.M., Walchak C.G., Sourby J.C., Smith R.E., Francis K.D., Otterburn M.S. Clinical assessment of Salatrim, a reduced-calorie triacylglycerol. *J. Agric. Food Chem.* **1994**, 42, 581-596
 - (37) Sørensen L.B., Cueto H.T., Andersen M.T., Bitz C., Holst J.J., Rehfeld J.F., Astrup A. The effect of salatrim, a low-calorie modified triacylglycerol, on appetite and energy intake. *Am. J. Clin. Nutr.* **2008**, 87, 1163-1169
 - (38) Gentry C.E. カブレニン-新しい低カロリー油脂. *月刊フードケミカル*. **1992**, 5, 68-71
 - (39) Webb D.R., Sanders R.A. Caprenin 1. Digestion, absorption, and rearrangement in thoracic duct-cannulated rats. *J. Am. Coll. Toxicol.* **1991**, 10, 325-340
 - (40) Webb D.R., Peters J.C., Jandacek R.J., Fortier N.E. Caprenin 2. Short-term safety and metabolism in rat and hamsters. *J. Am. Coll. Toxicol.* **1991**, 10, 341-356
 - (41) Peters J.C., Holcombe B.N., Fuller L.K., Webb D.R. Caprenin 3. Absorption and caloric value in adult humans. *J. Am. Coll. Toxicol.* **1991**, 10, 357-367
 - (42) Webb D.R., Wood F.E., Bertram T.A., Fortier N.E. A 91-day feeding study in rats with caprenin. *Food Chem. Toxicol.* **1993**, 31, 935-946

- (43) 佐藤清隆 結晶性油脂の構造と物性 *油化学* **1995**, 44, 702-712
- (44) 遠藤泰志 構造脂質とその機能性 *日本食品化学工学会誌* **1996**, 43, 1163-1169
- (45) チョコレート添加剤 平 4-58941
- (46) Thomas A., Allouche M., Basyn F., Brasseur R., Kerfelec B. Role of the lid hydrophobicity pattern in pancreatic lipase activity. *J. Biol. Chem.* **2005**, 280, 40074-40083
- (47) Bottino N.R., Vandenburg G.A., Reiser R. Resistance of certain long-chain polyunsaturated fatty acids of marine oils to pancreatic lipase hydrolysis. *Lipids* **1967**, 2, 489-493
- (48) Yang L.Y., Kuksis A., Myher J.J. Lipolysis of menhaden oil triacylglycerols and the corresponding fatty acid alkyl esters by pancreatic lipase in vitro: a reexamination. *J. Lipid Res.* **1990**, 31, 137-147
- (49) Formo W.W. General chemical reactions of fatty acids. In *Industrial Fatty Acids and Their Applications* (E.S. Pattison, ed.). *Reinhold Publishing, New York.* **1959**, 62-63
- (50) Bauer S.T., Gill P.R., Price R.E. Preparation and properties of esters of monohydric alcohols and fatty acids of tall oils. *J. Am. Oil Chem. Soc.* **1961**, 38, 127-130
- (51) Han L.K., Kimura Y., Okuda H. Reduction in fat storage during chitin-chitosan treatment in mice fed a high-fat diet. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **1999**, 23, 1157-1173
- (52) Kanjilal S., Prasad R.B., Kaimal T.N., Ghafoorunissa, Rao S.H. Synthesis and estimation of calorific value of a structured lipid-potential reduced calorie fat. *Lipids* **1999**, 34, 1045-1055
- (53) Folch J., Lees M., Sloane Stanley, G.H. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **1957**, 226, 497-509
- (54) Mattson F.H., Streck J.A. Effect of the consumption of glycerides containing behenic acid on the lipid content of the heart of weanling rats. *J. Nutr.* **1974**, 104, 483-488
- (55) Ikeda I., Imasato Y., Nakayama M., Imaizumi K., Sugano M. Lymphatic transport of stearic acid and its effect on cholesterol transport in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* **1994**, 40, 275-282
- (56) Yagi T., Yasuda F., Fushimi N., Hara Y., Nakagiri H., Hamada T., Ikeda I., Igarashi O. Lymphatic absorption of structured triacylglycerols, 1(3)-stearoyl-2,3 (1)-dilinoleoylglycerol and 2-linoleoyl-1,3-distearoylglycerol in rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol. (Tokyo).* **2004**, 50, 446-448
- (57) Vistisen, Mu H., Høy C.E. The recovery of ¹³C-labeled oleic acid in rat lymph after administration of long chain triacylglycerols or specific structured triacylglycerols. *Eur. J. Nutr.* **2006**, 45, 363-368

- (58) Schmid R.D., Verger R. Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1998**, 37, 1608-1633
- (59) Carrière F., Grandval P., Gregory P.C., Renou C., Henniges F., Sander-Struckmeier S., Laugier R. Does the pancreas really produce much more lipase than required for fat digestion? *J.O.P.* **2005**, 6, 206-215
- (60) Arishima T., Tsujii S., Kohno M., Takamatus K., Sagi N., Imaizumi K., Okuda H. Suppressive effect of 1-behenoyl-2,3-dioleoyl-*rac*-glycerol (BOO) on postprandial serum triacylglycerol elevation. *Jpn. Pharmacol. Ther.* **2007**, 35, 1069-1075
- (61) Reeves, Nielsen F.H., Fahey G.C. Jr. AIN-93 purified diets for laboratory rodents: final report of the American Institute of Nutrition ad hoc writing committee on the reformulation of the AIN-76A rodent diet. *J. Nutr.* **1993**, 123, 1939-1951
- (62) Fletcher M.J. A colorimetric method for estimating serum triglycerides. *Clin. Chim. Acta* **1968**, 22, 393-397
- (63) Sperry W.M., Webb M. A Revision of the schoenheimer-spry method for cholesterol determination. *J. Biol. Chem.* **1950**, 187, 97-106
- (64) Ginsberg H.N., Zhang Y.L., Hernandez-Ono A. Regulation of plasma triglycerides in insulin resistance and diabetes. *Arch. Med. Res.* **2005**, 36, 232-240
- (65) Harris W.S. Fish oils and plasma lipid and lipoprotein metabolism in humans: a critical review. *J. Lipid Res.* **1998**, 30, 785-807
- (66) Pfeuffer M., Barth C.A. Modulation of very low-density lipoprotein secretion by dietary protein is age-dependent in rats. *Ann. Nutr. Metab.* **1986**, 30, 281-288
- (67) Ikeda I., Hamamoto R., Uzu K., Imaizumi K., Nagao K., Yanagita T., Suzuki Y., Kobayashi M., Kakuda T. Dietary gallate esters of tea catechins reduce deposition of visceral fat, hepatic triacylglycerol, and activities of hepatic enzymes related to fatty acid synthesis in rats. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **2005**, 69, 1049-1053
- (68) Murase T., Nagasawa A., Suzuki J., Hase T., Tokimitsu I. Beneficial effects of tea catechins on diet-induced obesity: stimulation of lipid catabolism in the liver. *Int. J. Obes. Relat. Metab. Disord.* **2002**, 26, 1459-1464
- (69) Ikeda I., Kumamaru J., Nakatani N., Sakono M., Murota I., Imaizumi K. Reduced hepatic triglyceride secretion in rats fed docosahexaenoic acid-rich fish oil suppresses postprandial hypertriglyceridemia. *J. Nutr.* **2001**, 131, 1159-1164
- (70) Baillie R.A., Takada R., Nakamura M., Clarke S.D. Coordinate induction of peroxisomal acyl-CoA oxidase and UCP-3 by dietary fish oil: a mechanism for decreased body fat deposition. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **1999**, 60, 351-356
- (71) Clarke S.D. Polyunsaturated fatty acid regulation of gene transcription: a mechanism to improve energy balance and insulin resistance. *Br. J. Nutr.* **2000**, 83, S59-S66

- (72) 井出隆 血中の脂質濃度を抑えるメカニズム 肝臓のトリグリセリド合成の制御機構と食品成分 *化学と生物* **1994**, 32, 106-113
- (73) Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Rnadall R.J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **1951**, 193, 265-275
- (74) Kelley D.S., Nelson G.J., Hunt J.E. Effect of prior nutritional status on the activity of lipogenic enzymes in primary monolayer cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.* **1986**, 235, 87-90
- (75) Markwell M.A.K., McGroarty E.J., Bieber L.L., Tolbert N.E. The subcellular distribution of carnitine acyltransferases in mammalian liver and kidney. *J. Biol. Chem.* **1973**, 248, 3426-3432
- (76) Hashimoto T., Miyazawa S., Gunarso D., Furuta S. alpha-Amanitin inhibits the oxidation of long chain fatty acids in mouse liver. *J. Biochem.* **1981**, 90, 415-421
- (77) Ochoa S. "Malic" enzyme. *Methods Enzymol.* **1955**, 13, 739-753
- (78) Kelley D.S., Kletzien R.F. Ethanol modulation of the hormonal and nutritional regulation of glucose 6-phosphate dehydrogenase activity in primary cultures of rat hepatocytes. *Biochem. J.* **1984**, 217, 543-549
- (79) Schulz H. Beta oxidation of fatty acids. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 28, 109-120
- (80) Osmundsen H., Bremer J., Pedersen J.I. Metabolic aspects of peroxisomal beta-oxidation. *Biochim. Biophys. Acta* **1991**, 11, 141-158
- (81) Lazarow P.B., Duve C.D. A fatty acyl-CoA oxidizing system in rat liver peroxisomes; enhancement by clofibrate, a hypolipidemic drug. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1976**, 73, 2043-2046
- (82) 須賀哲弥 ペルオキシソームの機能(1)脂質代謝 *蛋白質核酸酵素* **1990**, 35, 1408-1417
- (83) Guzmána M., Geelen M.J.H. Regulation of fatty acid oxidation in mammalian liver. *Biochim. Biophys. Acta* **1993**, 1167, 227-241
- (84) Thomassen M.S., Christiansen E.N., Norum K.R. Characterization of the stimulatory effect of high-fat diets on peroxisomal beta-oxidation in rat liver. *Biochem. J.* **1982**, 15, 195-202
- (85) Bernhard K., Vischer E. Decomposition of behenic acid in the animal body. *Helv. Chim. Acta* **1946**, 29, 929-935
- (86) Science and Technology Agency. Standard Table of Food Composition in Japan. 5th Edition (in Japanese). Printing Bureau of the Ministry of Finance. Tokyo **2001**
- (87) 秦野食品薬品安全研究所 Report on acute toxicity study of BOB in rats. *Bohenin GRAS* p.00419-00431, Oct 15th **1998**

- (88) 秦野食品薬品安全研究所 Report on bacterial/mammalian microsome mutagenic test of BOB. *Bohenin GRAS* p.00432-00444, Oct 19th **1988**
- (89) Granlund L., Larsen L.N., Christiansen E.N., Pedersen J.I. Absorption of very-long-chain saturated fatty acids in totally hydrogenated fish oil. *Br. J. Nutr.* **2000**, 84, 681-688
- (90) Charnock J.S., McLennan P.L., Abeywardena M.Y., Russell G.R. Altered levels of n-6/n-3 fatty acids in rat heart and storage fat following variable dietary intake of linoleic acid. *Ann. Nutr. Metab.* **1985**, 29, 279-288
- (91) Hye-Kyeong Kim., Haymie Choi. Dietary α -linoleic acid lowers postprandial lipid levels with increase of eicosapentaenoic and docosahexaenoic acid contents in rat hepatic membrane. *Lipids* **2001**, 36, 1331-1336
- (92) Nalbone G., Termine E., Leonardi J., Portugal H., Lechene P., Calaf R., Lafont R. Effect of dietary salmon oil feeding on rat heart lipid status. *J. Nutr.* **1988**, 118, 809-817
- (93) Charnock J.S., Abeywardena M.Y., McLennan P.L. Comparative changes in the fatty-acid composition of rat cardiac phospholipids after long-term feeding of sunflower seed oil- or tuna fish oil-supplemented diets. *Ann. Nutr. Metab.* **1986**, 30, 393-406
- (94) Lewin M.B., Timiras P.S. Lipid changes with aging in cardiac mitochondrial membranes. *Mech. Ageing Dev.* **1984**, 24, 343-351
- (95) McGee C.D., Lieberman P., Greenwood C.E. Dietary fatty acid composition induces comparable changes in cardiolipin fatty acid profile of heart and brain mitochondria. *Lipids* **1996**, 31, 611-616
- (96) Yamaoka S., Urade R., Kito M. Cardiolipin molecular species in rat heart mitochondria are sensitive to essential fatty acid-deficient dietary lipids. *J. Nutr.* **1990**, 120, 415-421
- (97) Yamaoka S., Urade R., Kito M. Mitochondrial function in rats is affected by modification of membrane phospholipids with dietary sardine oil. *J. Nutr.* **1998**, 118, 290-296

謝辞

本研究は、筆者が東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 食品機能健康科学講座 食品化学分野および不二製油株式会社 基盤研究所で行った研究成果を纏めたものです。

本研究の遂行にあたり、終始御指導および御鞭撻を賜りました東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 食品機能健康科学講座 食品化学分野 池田郁男教授に深謝致します。

社会人として研究室生活を送るにあたり、多くの御協力を賜りました東北大学大学院農学研究科 生物産業創成科学専攻 食品機能健康科学講座 食品化学分野 都築毅准教授、同分野 井上奈穂助教に心より感謝致します。

本研究の遂行にあたり、社会人学生として良き研究環境を与えて下さいました不二製油株式会社 海老原善隆会長、同社 清水洋史社長、同社 研究開発本部 前田裕一本部長、廣塚元彦本部長補佐、同社 基盤研究所 木田晴康所長に深謝致します。

本研究の遂行にあたり、社会人としての研究生活に多くの御支援を賜り、また多大な御指導を賜りました不二製油株式会社 基盤研究所 健康機能研究室 河野光登室長、同研究室 橘伸彦博士に深く感謝致します。また本研究を遂行するにあたり、サンプル調製並びに御助言頂きました同社 食品素材研究所 油脂開発室 有島俊治室長に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、実験のサポートを下さいました不二製油株式会社 基盤研究所 健康機能研究室一同に厚く感謝致します。また、本研究の遂行に多くの御配慮と温かい励ましを下さいました同研究所 油脂研究室一同に厚く感謝致します。

最後に、これまで精神的に支えて下さった両親、友人に深い感謝の意を表して謝辞と致します。